

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

**PROTEINI INTRINZIČNO NEUREĐENE STRUKTURE I NJIHOVE
INTERAKCIJE NA PRIMJERU p53**

**PROTEINS OF INTRINSICALLY DISORDERED STRUCTURE
AND THEIR INTERACTIONS USING p53 PROTEIN AS AN
EXAMPLE**

SEMINARSKI RAD

Jurica Matković

Preddiplomski studij biologije
(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
2. INTRINZIČNA NEUREĐENOST PROTEINA.....	4
2.1. Karakterizacija neuređene strukture proteina.....	4
2.2 . Opće karakteristike.....	6
2.3. Termodinamika vezanja intrinzično neuređenih proteina.....	7
2.4. Regulacija afiniteta posttranslacijskim modifikacijama	10
2.5. Funkcije intrinzično neuređenih proteina u stanici.....	11
2.6. Proteoforme.....	13
3. PROTEIN p53.....	15
3.1. Opće karakteristike proteina p53.....	15
3.2. Pregled domena i regija proteina p53.....	17
3.3. N-terminalna transaktivacijska domena.....	18
3.4. α -zavojnica N-terminalne domene proteina p53.....	21
3.5. C-terminalna bazična regija	25
3.6. Proteoforme proteina p53.....	27
3.7. Kontrola degradacije p53 preko N-terminalne domene.....	33
4. LITERATURA.....	36
5. SAŽETAK.....	38
6. SUMMARY.....	38

1. UVOD

Godine 1959. riješena je prva trodimenzionalna struktura proteina, mioglobina. Sljedećih 50 godina obilježio je nagli razvoj strukturne biologije i do 1999. 9000 proteinskih struktura je bilo već pohranjeno u bazi *Protein Data Bank*. Kako je raslo znanje o tercijarnim strukturama proteina, raslo je i uvjerenje da je biološka funkcija proteina određena njegovom definiranom trodimenzionalnom strukturom. To je rezultiralo rođenjem centralne dogme strukturne biologije; svaki protein mora imati definiranu, stabilnu i rigidnu strukturu da bi mogao vršiti određenu funkciju. U počecima razvoja proteinske kemije, metode kojima su se određivale trodimenzionalne strukture proteina podrazumijevale su kristalizaciju pročišćenog proteina i difrakciju rendgenskih zraka na kristalu, što je omogućilo karakterizaciju isključivo proteina pravilne i definirane strukture, jer su jedino takvi mogli kristalizirati. Iako nema sumnje da postoji uska povezanost strukture i funkcije proteina, danas znamo da mnogi, biološki funkcionalni proteini nemaju stabilnu globularnu strukturu. Takve proteine nazivamo intrinzično neuređenim proteinima (INP). Velika količina sekvenciranih genoma i novije bioinformatičke metode daju nam uvid u realniju sliku proteoma stanice, te danas znamo da veliki dio genskih sekvenci ne kodira globularne proteine definirane strukture, nego dugačke nizove aminokiselina koji nemaju sklonost formiranja stabilne strukture u otopini. Velik udio tih sekvenci u genomima svih organizama upućuje na važnost njihovih funkcija, jer inače ne bi bilo razloga da opstanu tijekom evolucije. Karakterizacija konformacijske fleksibilnosti takvih sekvenci i njihove funkcije u stanici predstavlja glavni izazov suvremene strukturne biologije. Analize kristalne strukture ne mogu dati informacije o neuređenom stanju proteina, već mogu samo upućivati na njihovu prisutnost preko odsutnosti elektronske gustoće lokalnih regija kristaliziranog proteina. Tek razvojem modernih spektroskopskih metoda, kao što je nuklearna magnetska rezonancija poboljšane osjetljivosti i rezolucije, omogućena je karakterizacija neuređenih proteina u otopini. Danas možemo reći da je istraživanje intrinzično nestabilnih proteina u punom cvatu. Nova otkrića su dovela do radikalnih promjena u konceptu koji opisuje biološke događaje na molekularnoj razini. Neki autori čak smatraju da je na pomolu nova disciplina molekularne biologije, tako zvana „nestrukturna“ biologija.

Neuređenost proteina može biti lokalna ili globalna. Kod lokalne neuređenosti, samo određena regija proteina je strukturno neuređena, dok ostatak ima dobro definiranu strukturu.

Upravo takve regije često imaju ključne uloge u funkciji proteina i česte su u genomu. Mnogo takvih neuređenih segmenata sudjeluju u raznim interakcijama, te se prilikom vezanja svoje mete, najčešće drugog proteina, urede u definiranu trodimenzionalnu strukturu, što im omogućuje interakciju s više različitih partnera. Globalno neuređeni proteini nemaju definirane stabilne strukture. U povijesti, jedini poznati takvi proteini bili su mali peptidni hormoni, kao što je glukagon. Danas smo upoznati s brojnim primjerima globalno neuređenih proteina i velikih domena koje su neuređene u otopini, ali pri interakciji sa svojim veznim partnerom postaju uređene i poprimaju definirane strukture. Često su takvi proteini uključeni u neke od najvažnijih procesa u životu stanice, uključujući kontrolu staničnog ciklusa te regulaciju transkripcije i translacije. Upravo takva nedefinirana struktura i promiskuitet vezanja, kao i mogućnost dodatne modulacije funkcije različitim posttranslacijskim modifikacijama, daje stanici dodatnu razinu kontrole koja omogućuje vrlo brze i precizne odgovore na promjene okolišnih uvjeta. Jedan član takve skupine proteina je i protein p53.

2. INTRINZIČNA NEUREĐENOST PROTEINA

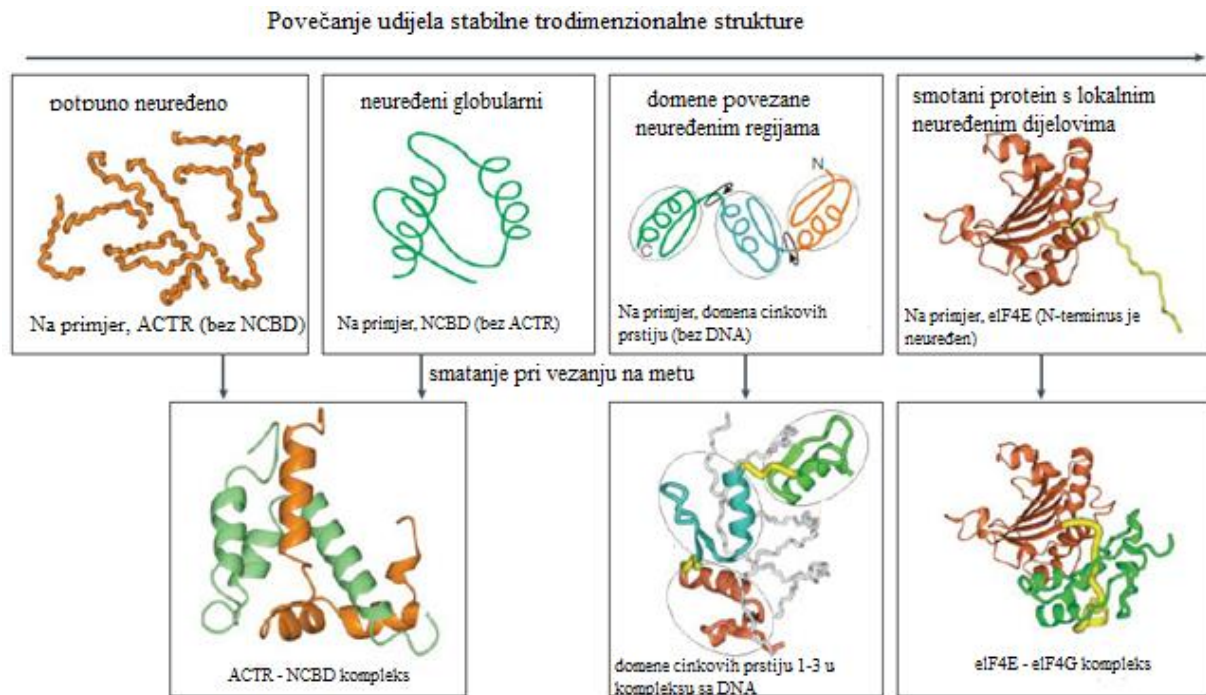
2.1 Karakterizacija neuređene strukture proteina

Predviđanje trodimenzionalne strukture globularnih proteina na temelju sekvence u genomu, još uvijek je veliki izazov, osim u situacijama kada sekvenca nekog proteina pokazuje homologiju sa onom već poznate strukture. Međutim, za razliku od karakterizacije strukture neuređenih dijelova proteina, identifikacija sekvenci koje odgovaraju intrinzično neuređenim domenama, odnosno koje se ne smataju u definiranu globularnu strukturu u prisutnosti stabilizirajućih interakcija, se pokazala relativno jednostavnom. Sekvencu neuređenih dijelova proteina karakterizira relativna jednostavnost. Većina ih sadrži veliki udio polarnih i nabijenih aminokiselina (Gln, Ser, Pro, Glu, Lys, te ponekad Gly i Ala), te mali udio aminokiselina s hidrofobnim bočnim ograncima (Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Tyr) koje bi inače formirale hidrofobnu jezgru globularnog proteina. Na temelju sastava aminokiselina, postoji podjela proteinskih domena na one bogate prolinom, glutaminom, kisele aktivacijske domene i druge, a ona se najčešće odnosi na neke regulatorne proteine. Danas postoji mnogo informatičkih programa za predviđanje neuređenih regija na temelju aminokiselinske sekvence, uključujući PONDR, FoldIndex, DisEMBL i DISOPRED2. Također, analize sekvenci cijelih genoma

upućuju na to da su intrinzično neuređeni proteini veoma zastupljeni, te da udio proteina koji sadrže takve sekvence raste s kompleksnošću organizma. Za većinu njih je utvrđeno da su uključeni u prijenos signala te u nastanak tumora kod višestaničnih dugoživećih eukariota. Postavlja se pitanje, zašto smo tek nedavno otkrili ovu zaista veliku skupinu proteina. Jedan od razloga je to što su klasične biokemijske metode bile namijenjene prvenstveno za produkciju i karakterizaciju smotanih, uređenih proteina. Nakon homogenizacije tkiva, dobiveni homogenat je bio testiran na željenu aktivnost a nakon toga podvrgnut frakcioniranju amonijevim sulfatom i različitim kromatografskim metodama. Dobivene frakcije su dodatno pročišćavane i takav protein je sekvenciran, a sljedeći korak je bilo određivanje njegove trodimenzionalne strukture. Takva metodologija je odmah u prvim koracima selektirala smotane proteine, jer homogenizacija stanica najčešće dovodi do oslobađanja proteaza iz različitih staničnih organela, a nesmotani proteini su puno podložniji degradaciji. Također, većina neuređenih proteina su regulacijski faktori prisutni samo u nekoliko kopija po stanici, zbog čega je njihova identifikacija u testu aktivnosti bila gotovo nemoguća. Danas, kada imamo pristup cijeloj knjižnici genomskih sekvenci, metodama genetskog inženjerstva, možemo nadeksprimirati bilo koji protein čija nam je sekvenca poznata, neovisno o tome znamo li njegovu funkciju. Također, većina neuređenih proteina i njihovih funkcija otkrivena je genetičkim metodama mutageneze, posebno brisanjem određenih gena iz genoma, pri čemu dobivamo „*knock-out*“ mutante. Nakon toga slijedi mapiranje tog gena ili određenog područja gena s tom funkcijom, kloniranje i nadekspresija gena, te pročišćavanje genskog produkta i karakterizaciju strukture. Jedna od najmoćnijih metoda za dobivanje informacije o potpunoj ili djelomičnoj neuređenosti proteina je NMR spektroskopija. Mana metode je to što se može koristiti samo za male proteine, jer su za karakterizaciju većih struktura potrebni veliki magneti za postizanje jakog magnetskog polja. Određivanje funkcije i funkcionalnih mjesta intrinzično neuređenih proteina pokazalo se puno težim zadatkom od identifikacije i lociranja intrinzično neuređenih sekvenci.

2.2 Opće karakteristike

Proteini se mogu klasificirati u 4 skupine s obzirom na stupanj uređenosti strukture: čvrsto smotani proteini definirane strukture građeni od jedne domene, proteini s više definirano smotanih domena povezanih fleksibilnim neuređenim regijama (engl. *Linked folded domains*), kompaktni, ali neuređeni globularni proteini (engl. *Molten globule*), te izduženi, heterogeno neuređeni proteini (engl. *Unstructured*). Između ovih kategorija postoji niz prijelaznih stanja i strukturalnih tipova (Slika 1.).



Slika 1. Kategorije proteina s obzirom na nativnu neuređenost strukture sa prikazanim primjerima i određenim njihovim interakcijama. ACTR (engl. binding domain from activator of thyroid hormone and retinoid receptors), NCBD (engl. nuclear coactivator binding domain of CREB-binding protein), eIF4E (eukariotski inicijacijski faktor 4E), eIF4G (eukariotski inicijacijski faktor 4G) (Preuzeto i prilagođeno iz Dyson i sur. 2005.)

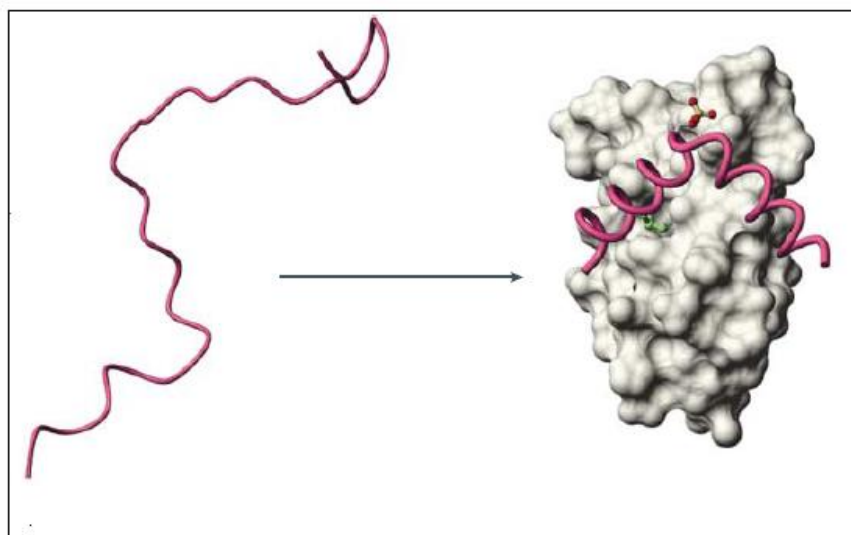
Proteini s intrinzično neuređenim sekvencama ne mogu formirati hidrofobnu srž, a pošto je smatanje globularnih proteina posljedica povećanja entropije otapala, odnosno vode, oni se ne mogu spontano smotati u definirane strukture. U funkcionalnom stanju postoje kao dinamični entiteti koji zauzimaju vrlo velik broj različitih konformacija koje mogu brzo prelaziti jedna u drugu u različitim vremenskim intervalima. U nekim slučajevima mogu nastati naizgled kompaktne strukture, ali one nikada nisu definirane i stalne. Takva stanja zovemo „molten

globule“. Međutim, proteini vrlo rijetko poprimaju potpuno nasumično neuređenu konformaciju, takozvanu „*random coil*“, a pogotovo ne u uvjetima koji nisu denaturacijski. Čak i u visoko nesmotanom stanju formiraju elemente sekundarne strukture ili dijelove hidrofobnih klastera koji im daju neki oblik okosnice. Također intrinzično neuređene dijelove često nalazimo u proteinima modularne građe, a to je većina eukariotskih proteina uključenih u staničnu signalizaciju. Oni sadrže više domena koje se smataju neovisno jedna o drugoj, a odvojene su regijama savitljivih poveznica (engl. *linker*), različite dužine i sekvence. Takve linearne sekvence su uglavnom bogate polarnim i nenabijenim aminokiselinama (Ser, Thr, Gln, Asn) ili malim aminokiselinama kao što su Ala, Gly ili Pro, a takav sastav im daje izduženi oblik. Njihova duljina može varirati. Kada nisu vezani na svoju metu, modularni proteini imaju dobro pokretne domene, pri čemu je primarna funkcija linkera da omogući njihovo sterički nesmetano pokretanje i pravilno vezanje drugog proteina s kojim ulazi u interakciju. Međutim, kod nekih proteina linkeru imaju dodatne i specifičnije funkcije. Na primjer, kod vezanja domene određenih proteina na svoju metu, DNA ili drugi protein, linker može poprimiti rigidnu i definiranu strukturu, što utječe na vezanje sljedeće domene tog proteina na način da smanjuje određene konformacijske slobode koje sljedeća domena može zauzeti i na taj način ju usmjerava na vezanje na točno određeni dio veznog partnera. Primjer su proteini koji imaju domenu cinkovih prstiju (engl. *zinc-finger domain*).

2.3 Termodinamika vezanja intrinzično neuređenih proteina

Mnogi intrinzično neuređeni proteini prelaze u stanje veće uređenosti pri interakciji s veznim partnerom jer se smataju u stabilnije sekundarne i tercijarne strukture od onih u nativnom stanju. Taj proces zovemo vezanje združeno sa smatanjem (engl. *coupled folding and binding*). Dakle, vezanje združeno sa smatanjem je proces u kojem se intrinzično neuređeni protein ili dio proteina smata u definiranu stabilnu strukturu pri vezanju svoje mete. Pri tome taj dio proteina gubi određeni stupanj konformacijske slobode i za taj proces postoji „entropijska cijena“, koja je kompenzirana promjenom entalpije vezanja. Na primjer, inducibilna domena kinaze KID, CREB transkripcijskog faktora (engl. *cyclic-AMP-response-element-binding protein*), fosforilirana (pKID), u otopini je u nativnom stanju i njezina struktura je neuređena. Ali kada veže KID-veznu domenu CREB-vezujućeg proteina (CBP), drugog transkripcijskog faktora, ona se smata u

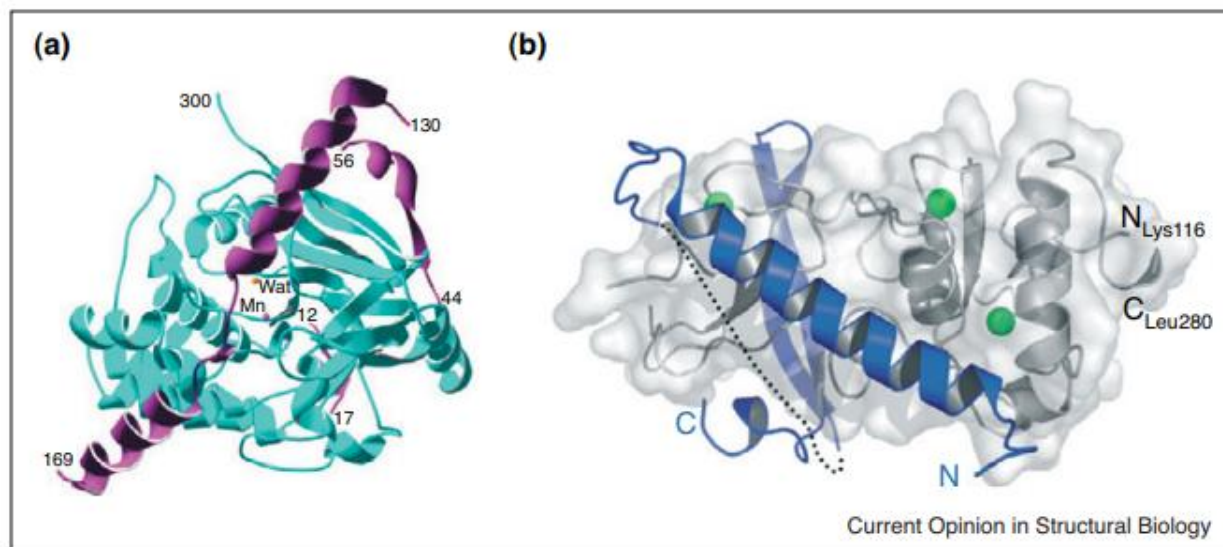
definiranu sekundarnu strukturu (Slika 2). To vezanje najčešće uključuje interakciju samo nekoliko aminokiselinskih ostataka, ali kod nekih proteina ono može uključivati i čitave domene proteina, kao na primjer vezanje HIF1 α polipeptida na TAZ1 domenu CBP ili p300 proteina (paralog CBP). CBP i p300 su glavni medijatori transkripcije koji povezuju brojne signalne puteve u stanici selektivnom indukcijom genetske ekspresije.



Slika 2. Prikaz vezanja neuređene pKID domene (ljubičasto) na KIX domenu CREB proteina. (Preuzeto i iz Dysoni sur. 2005.).

Ključna termodinamska „sila“ za reakciju vezanja je povoljni entalpijski doprinos. Vezanje združeno sa smatanjem omogućuje ostvarivanje vrlo visoke specifičnosti jer omogućava proteinu da ostvari brojne interakcije sa svojom metom, omatajući se, ponekad i u cijelosti oko nje. Međutim, takve interakcije su relativno niskog afiniteta, što je još jedna karakteristika proteina koji su uključenih u signalizaciju, jer jednako važno svojstvo takvih proteina je, osim velike specifičnosti vezanja prilikom inicijacije signalnog procesa, da također lako disociraju kada je signalizacija završena. Mehanizam vezanja združenog sa smatanjem omogućuje interakciju ekstremno velikih površina dvaju proteina čak kad su interagirajuće domene jako male zbog njihovog induciranog smatanja prilikom vezanja, što često rezultira omatanjem jedne domene oko druge. Kada ne bi interagirali na taj način, proteini bi trebali biti dva do tri puta veći da bi postigli jednako velike površine vezanja, što bi rezultiralo ili povećanom gužvom proteina u stanici ili povećanjem dimenzija same stanice.

Mnogi eksperimentalni dokazi ukazuju na to da je upravo interakcija dvaju proteina uzrok njihova smatanja. Međutim, taj model je znatno pojednostavljen u odnosu na stvarno stanje u stanici, jer intrinzično neuređeni proteini, čak i u vezanom stanju nemaju u potpunosti definiranu i stabilnu strukturu, te često njihove regije ostaju djelomično neuređene, a to može biti važno za njihovu funkciju. Taj fenomen „djelomične neuređenosti“ i u vezanom stanju opisuje se terminom „mutnost“ (engl. *fuzziness*) (Slika 3.).



Slika 3. Intrinzično neuređeni proteini vežu svog partnera kombinirajući više kratkih motiva što dovodi do povećane specifičnosti vezanja. a) Slika a (lijevo) prikazuje vezanje i omatanje inhibitora 2 na protein fosfatazu 1 pri čemu se veže pomoću tri vezna motiva (ljubičasto). b) Vezanje UPF 2 (plavo) na CH domenu UPF1 (sivo). Vidljivi su dijelovi UPF 2 neuređeni i u vezanom stanju (isprekidane točkice), što predstavlja fenomen koji zovemo „fuzziness“. (Preuzeto iz Tompa i sur. 2011.).

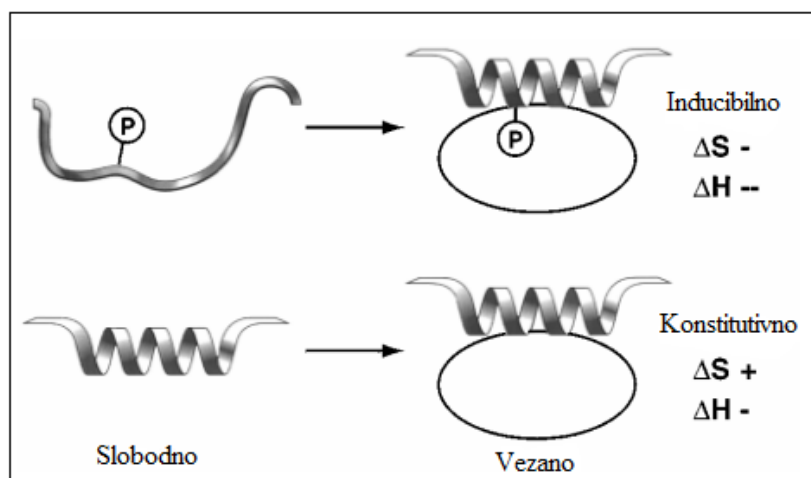
Slične posljedice vezanja se mogu uočiti i u interakciji intrinzično neuređenih domena s određenim sekvencama DNA. Eukariotski transkripcijski faktori sadrže najmanje dvije domene od kojih jedna veže molekulu DNA, a druga je aktivatorska domena i sudjeluje u aktivaciji transkripcije ulazeći u interakciju s proteinima transkripcijske mašinerije. Strukture brojnih DNA-veznih domena su određene i karakterizirane. Iako većina ima uvelike definiranu strukturu i u odsutnosti molekule DNA sa sekvencom na koju se veže, u mnogo slučajeva lokalno neuređeni segmenti mogu sudjelovati u vezanju DNA. Dobar primjer je bazična DNA-vezna regija domene cinkovih prstiju nekih proteina, koja je velikim dijelom neuređena u odsutnosti molekule DNA, ali se smata u stabilnu helikalnu strukturu pri vezanju na svoju specifičnu

sekvencu. NMR pokusi pokazuju da bazična regija privremeno formira helikalnu strukturu u nevezanom stanju koja značajno smanjuje entropijsku cijenu vezanja DNA. Međutim, još uvijek postoji veliki gubitak konformacijske entropije pri vezanju DNA, koja je rezultat smatanja bazične regije u α -zavojnici. Ta potreba za induciranim smatanjem pri vezanju DNA povećava specifičnost vezanja.

2.4 Regulacija afiniteta posttranslacijskim modifikacijama

Vezanje intrinzično neuređenih proteina na njihove mete je često regulirano kovalentnim modifikacijama koje djeluju kao jednostavni molekularni prekidači. Takvi procesi zahtijevaju vezanje na više od jedne mete, odnosno, vezanje najmanje dva proteina; modificirajućeg enzima i fiziološkog receptora. Konformacijske potrebe za vezanje svake mete se razlikuju. To je razlog zašto intrinzično neuređeni proteini pokazuju veliki promiskuitet vezanja širokog spektra veznih partnera. Važan regulatorni mehanizam koji to omogućuje su upravo posttranslacijske modifikacije regulatornih regija na brojnim mjestima koje predstavljaju neku vrstu „koda“ koji određuje biološki odgovor. Posttranslacijske modifikacije omogućuju proteinu da se veže na svoju fiziološku metu, ali i na niz drugih proteina, s kojima u nativnom stanju nije mogao stupiti u interakciju. Na taj način određena kombinacija, odnosno uzorak posttranslacijskih modifikacija omogućuje reverzibilno formiranje kompleksa s izuzetno visokom specifičnošću. Već spomenuti primjer je kinazno-inducibilna domena (KID) CREB proteina. Ta se aktivacijska domena veže velikim afinitetom za KIX domenu CBP proteina, ali samo kada je KID domena fosforilirana na Ser133. Fosforilirana KID (pKID) domena je intrinzično neuređena u slobodnom stanju, ali se smata u dvije ortologne α -zavojnice (α -A i α -B) pri vezanju na KIX domenu CBP proteina. Vezanje pKID na CBP je entropijski nepovoljno ($\Delta S = -6 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), zbog formiranja kompleksnijeg motiva zavojnice iz neuređene strukture što dovodi do ograničavanja konformacijskih sloboda, ali entalpijski povoljno ($\Delta H = -10,6 \text{ kcal mol}^{-1}$), zbog nastanka povoljnih vodikovih veza između fosfatne skupine na Ser133 s tirozinskim bočnim ogrankom i elektrostatskih interakcija iste sa lizinskim bočnim ogrankom KIX domene. Kada KID domena nije fosforilirana, entropijska cijena smatanja pri vezanju KIX domene toliko smanji afinitet vezanja da je njezina konstanta disocijacije milimolarnog reda. U aktiviranom stanju, fosforilna grupa može ostvariti brojne vodikove i elektrostatske interakcije s proteinom, dovodeći do jako

negativne promjene entalpije vezanja, koja nadomješta gubitak entropije i čini vezanje termodinamski povoljnim. To je primjer na koji način posttranslacijske modifikacije mogu inducirati interakciju dvaju proteina. Kod vezanja proteina definirane strukture na metu, promjena entropije vezanja je uglavnom pozitivna te takvo vezanje zovemo konstitutivno (Slika4.).



Slika 4. Shematski dijagram prikazuje kako fosforilacija određuje inducibilnost vezanja intrinzično neuređenog proteina na njegovu metu i konstitutivno vezanje proteina definirane strukture. (Preuzeto i prilagođeno iz Wright i sur. 1999.).

2.5 Funkcije intrinzično neuređenih proteina u stanicima

Svakodnevno se otkrivaju novi primjeri proteina s intrinzično neuređenim dijelovima. Najčešće se radi o proteinima koji sudjeluju u regulaciji transkripcije i translacije, staničnoj signalizaciji, fosforilaciji proteina, pohrani malih molekula te u regulaciji sklapanja makromolekularnih kompleksa kao što su ribosomi. Također javljaju se često u procesima regulacije smatanja proteina i RNA. Smatra se da oni svojim ulogama komplementiraju biološke aktivnosti uređenih proteina i regija. Vrlo često, intrinzična neuređenost se susreće u proteinima koji su uključeni u regulaciju staničnog ciklusa. Jedna od karakteristika tih proteina je kratko vrijeme poluživota i veliki obrtni broj (engl. *turnover*), koji je posljedica njihove intrinzične neuređenosti u odsutnosti veznog partnera. Takva relativna nestabilnost intrinzično neuređenih proteina daje dodatnu razinu stanične kontrole degradacijom. Pretpostavlja se da glavnu ulogu u

tome imaju linkerske regije. Zbog malog udjela hidrofobnih bočnih ogranaka, linkerske regije proteina nisu sposobne formirati stabilnu hidrofobnu jezgru te su ti bočni ogranci izloženi okolnom otapalu. Upravo takve solvatirane bočne ogranke prepoznaju proteasomi, kompleksi za degradaciju.

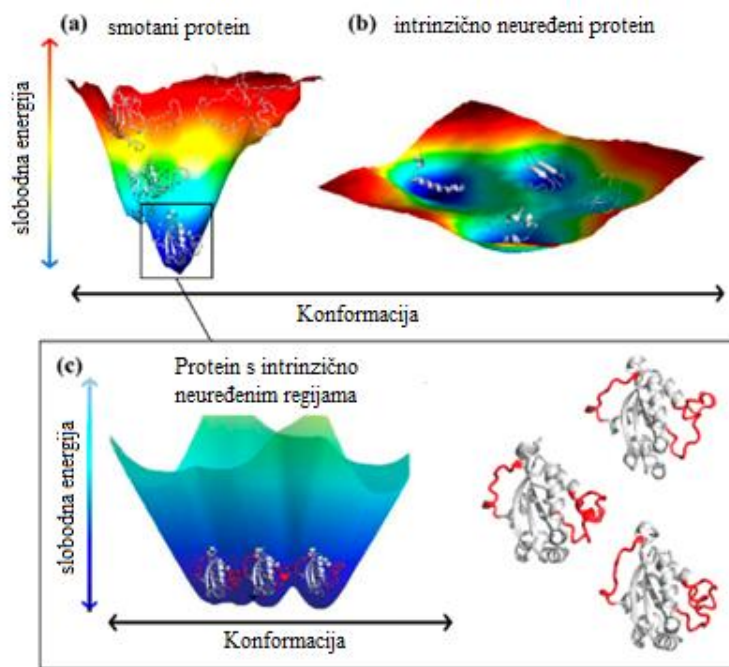
Iako određene biološke funkcije kao što su enzimska kataliza, imunološko prepoznavanje i specifično prepoznavanje receptora ovise o definiranoj trodimenzionalnoj strukturi njihovih aktera, puno staničnih funkcija kao što su signalizacija mogu izvršavati jednostavne linearne sekvence ili izolirani motivi određene sekundarne strukture. Intrinzično neuređeni proteini koji se inducirano smataju u interakciji sa drugim molekulama, nude nekoliko važnih prednosti u sustavima koji su uključeni u staničnu signalizaciju i regulaciju. Oni su izuzetno fleksibilni i njihova se struktura može lako promijeniti pod utjecajem okoline. Takva plastičnost može omogućiti jednom proteinu da prepozna velik broj bioloških meta bez da žrtvuje specifičnost vezanja. Naprotiv, upravo smatanje združeno sa vezanjem neuređene domene proteina može značajno doprinijeti specifičnosti molekularnog prepoznavanja kao što je opisano u prethodnim odlomcima. Termodinamska posljedica združenog smatanja i vezanja je ta da slobodna energija mora biti potrošena da bi dovela do uređenja te domene proteina, a cijena se plaća smanjenjem ukupne slobodne energije kompleksa, tako da se visoki afiniteti vezanja mogu postići samo kad je komplementarnost partnera maksimalna. Takvo fino termodinamsko balansiranje znači da vezanje može biti regulirano staničnim signalima ili preko interakcija s drugim komponentama stanične mašinerije. Već je opisan primjer vezanja CREB aktivacijske domene na CBP koja je inducirana fosforilacijom koja dramatično povećava afinitet vezanja povećavajući komplementarnost. Na sličan način, afinitet kojim se neuređeni protein veže na svoju metu može biti reguliran smatanjem koje je inducirano interakcijama s drugim proteinima ili nukleinskim kiselinama unutar multimernog kompleksa. Također, vrlo često je strukturna neuređenost zastupljena u proteinima koji su uključeni u nastanak određenih bolesti kao što su rak, dijabetes, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Bolesno stanje može nastati zbog krivog smatanja proteina, ali i zbog ostvarivanja nepoželjnih interakcija u mreži signala u kojima taj protein sudjeluje. Neki INP su uključeni u promociju amiloidnih bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti. Parkinsonova bolest i prionske bolesti su povezane sa promjenama u intrinzično neuređenim proteinima. Zbog pogrešnog smatanja neki dijelovi proteina poprimaju drugačije konformacije, a najpoznatije su prijelazi strukture u plosnate β -ploče koje dovode do agregacije

proteina pri čemu nastaju različiti plakovi štetni za stanicu. Također takvi proteini pokazuju izuzetno štetni utjecaj na stanicu ako se previše eksprimiraju i ako se nalaze u prevelikoj koncentraciji u stanici. Razlog tome je njihov vezni promiskuitet.

2.6 Proteoforme

Danas znamo da je hipoteza jedan gen-jedan enzim, prema kojoj svaki gen kodira jedan protein koji utječe na samo jedan korak nekog metaboličkog puta, prejednostavna. Situacija u stanici je puno složenija. Broj aktivnih gena u genomu čovjeka je (20 000) puno manji od ukupnog broja različitih proteina (>2 milijuna). Postoji nekoliko mehanizama kojima se od jednog gena može dobiti više proteina s različitim funkcijama, a oni uključuju predtranslacijske mehanizme kao što su alternativno prekrajanje i alelne varijacije te cijeli niz posttranslacijskih modifikacija, koje su najvećim dijelom odgovorne za toliku kompleksnost biološke mašinerije. Sve molekularne oblike koje proteinski produkt jednog gena može poprimiti, uključujući promjene zbog genetske varijacije, alternativnog prekrajanja i posttranslacijskih modifikacija, zovemo proteoforme. Intrinzično neuređeni proteini su bogati izvor proteoformi. Razlog tome je taj što se većina posttranslacijskih modifikacija događa upravo na intrinzično neuređenim dijelovima, a većina mjesta na kojima se događa prekrajanje kodira također intrinzično neuređene dijelove. Također, prisutnost intrinzične neuređenosti daje još veću razinu kompleksnosti. Čak i dobro smotani proteini pravilne strukture se nemogu smatrati rigidnim entitetima, te je konformacijska fleksibilnost i strukturna dinamika globularnih proteina, pa čak i enzima, ključna za njihovu funkciju. Energetski dijagram smatanja uređenih proteina ima stožast oblik na kojem gornji široki dio predstavlja skup nesmotanih konformacija, a usko dno predstavlja nativnu strukturu najniže energije. Za razliku od njih, intrinzično neuređeni proteini imaju potpuno drugačiji dijagram smatanja (Slika 6.). On je relativno plosnat i ravan, s puno malih energetskih minimuma koji odgovaraju različitim konformacijama. Međutim, čak i kod uređenijih globularnih proteina na dnu i u nativnoj konformaciji nalazimo nekoliko minimuma koji odgovaraju različitim konformacijama native strukture. To znači da je i svaka strukturna proteoforma skup više konformacijskih proteoformi sama po sebi jer predstavlja skup struktura odnosno konformacija koje prelaze jedna u drugu. Stvar se dodatno komplicira činjenicom da svaki protein interagira sa cijelim nizom veznih partnera u staničnom okolišu koji sadrži izuzetno

velike makromolekularne koncentracije, a svaka interakcija može utjecati na nastanak dodatnih konformacija.



Slika 6. Shematski prikaz energetskog dijagrama smatanja za a) uređeni protein i b) INP, te c) uvećani prikaz dna energetskog dijagrama za protein s uređenim domenama povezanim neuređenim linkerima. (Preuzeto i prilagođeno iz Uverski i sur. 2016.).

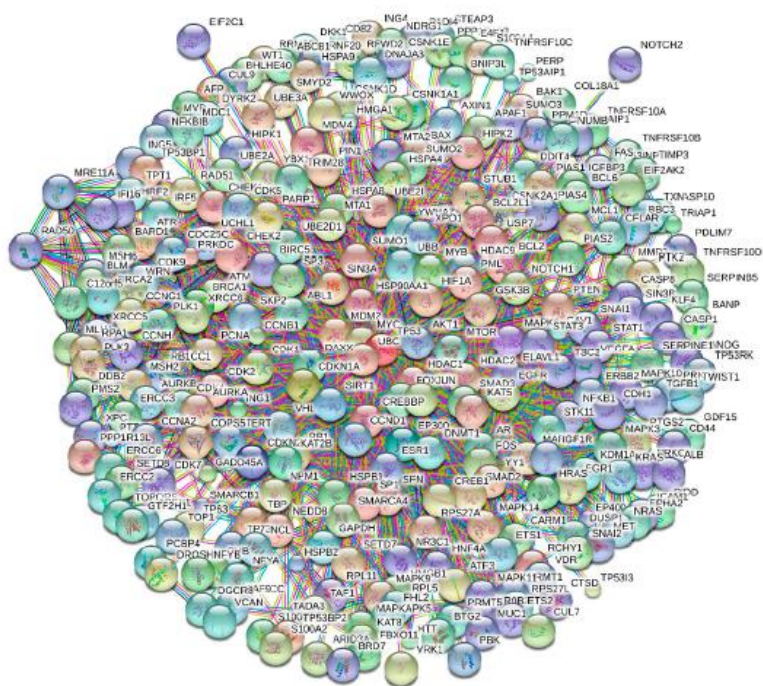
3. PROTEIN p53

Kao što smo vidjeli u prethodnim odlomcima, funkcija proteina je potpuno ovisna o njegovoj strukturi, ali ona sama ne mora biti definirana. Kao primjer proteina s intrinzično neuređenim dijelovima strukture poslužit će p53 koji ulazi u brojne interakcije s drugim proteinima. Zbog takve kompleksne mreže interakcija koje daju cijeli spektar različitih fizioloških odgovora, kako na razini stanice tako i organizma, strukturne informacije mogu biti ključne u odabiru vjerodostojnih bioloških modela u odnosu na one koji su manje vjerojatno fiziološki važni. U nastavku ovog rada, opisat će se karakteristike proteina p53 koje se odnose na njegovu intrinzičnu neuređenost te neke interakcije objašnjene u svjetlu onoga što je rečeno za opća svojstva intrinzično neuređenih proteina u prvom dijelu teksta.

3.1 Opće karakteristike proteina p53

Protein p53 je otkriven kao stanični protein u stabilnom kompleksu s velikim proteinom T onkogenom tumorskog virusa SV40, koji je tada bio popularni molekularni alat za uvođenje eksperimentalnih neoplastičnih transformacija i za proučavanje biologije transformiranih stanica. Od tada daljnje istraživanje tog proteina dalo je izuzetno zanimljiva i važna saznanja. Naime, samo otkriće da T onkoprotein interagira s tim, tada nepoznatim, staničnim proteinom vrlo specifično, preusmjerilo je istraživanja na karakterizaciju proteina p53. Smatralo se da bi asignacija njegove strukture mogla dati nove uvide u mehanizme transformacija stanica tumorskim DNA-virusima. Međutim, osim što su otkriveni detalji mehanizma djelovanja tumorskih virusa, pokazalo se da je p53 ključni akter u gotovo svim tipovima ljudskih malignih tumora, što je bilo poprilično iznenađujuće otkriće. Danas znamo da je p53 produkt glavnog gena supresora tumora koji je najčešća meta genetskih mutacija i promjena u ljudskim tumorima. To je potaknulo opsežna istraživanja koja su otkrila složenu mrežu interakcija u kojoj je p53 glavni regulatorni protein koji regulira cijeli spektar biokemijskih aktivnosti kako bi pokrenuo različite biološke odgovore na razini i stanice i organizma. U normalnim stanicama p53 je u latentnom stanju i u vrlo niskoj koncentraciji zbog velikog obrtnog broja. Aktivacija tog proteina uključuje povećanje ukupne količine p53, kao i kvalitativne promjene u samom proteinu. Molekularni mehanizmi odgovorni za unutarstaničnu konverziju proteina p53 iz latentnog u aktivno stanje vrlo su složeni. Za sada znamo da uključuju kombinacije posttranslacijskih modifikacija njega

samog i interakcije s drugim proteinima. Rezultat tih procesa su konformacijske promjene u proteinu p53 što povećava njegov biokemijski spektar funkcija. Od postranslacijskih modifikacija najbolje su opisane fosforilacije N-terminalne i C-terminalne domene. p53 ima vrlo veliki vezni promiskuitet. Broj poznatih veznih partnera s kojima ulazi u interakciju je golem i stalno raste (više od 1000), a mnogi od njih su važni regulatorni proteini (Slika 7.).



Slika 7. Prikaz interaktoma humanog proteina p53. (Preuzeto iz Uverski i sur. 2016.).

Razlog tome su upravo intrinzično neuređeni dijelovi njegove strukture. Uključen je u brojne esencijalne stanične procese kao što su zaustavljanje stanice u G1 i G2 fazi staničnog ciklusa i u indukciji apoptoze. Ima direktni utjecaj na održavanje genomskog integriteta aktivacijom gena čiji produkti sudjeluju u popravku DNA, te direktno sudjeluje u popravku, a po novijim saznanjima i u kontroli kvalitete replikacije. Neke od tih aktivnosti mogu biti posredovane njegovim nestimuliranim stanjem koje je latentno za većinu drugih biokemijskih reakcija. Također djeluje i kao transkripcijski aktivator, pri čemu može vezati specifične sekvence DNA određenih gena i na taj način promovirati njihovu transkripciju. Dakle, p53 je jedan vrlo svestrani protein čija je stanična aktivnost regulirana interakcijama s nizom drugih proteina.

3.2 Pregled domena i regija proteina p53

Humani protein p53 dug je 393 aminokiseline. Građen je od nekoliko proteinskih domena koje variraju veličinom od 40 do 200 aminokiselina. Razlikujemo 3 glavne domene u proteinu p53: transaktivacijska domena (1-70 aminokiselina), DNA-vezna domena (94-293 aminokiselina) i tetramerizacijska domena (324-355 aminokiselina), međusobno povezane linkerskim regijama.

- 3.2.1** Transaktivacijska domena se proteže od 1-70 aminokiseline, odnosno predstavlja N-terminalni dio proteina p53. Ona je intrinzično neuređena u otopini te ulazi u interakciju s mnogo proteina te će upravo zbog tog svojstva biti opisana detaljnije u nastavku.
- 3.2.2** DNA-vezna domena je vjerojatno najznačajnija domena jer je najčešće povezana s tumorogenezom kod ljudi. Proteže se od 94-293 aminokiseline i specifično se veže na određene sekvence DNA.
- 3.2.3** Oligomerizacijska domena se proteže od 324-355 aminokiseline i označava se kao C-terminus proteina p53. I njezina trodimenzionalna struktura je asignirana difrakcijom rendgenskih zraka i NMR spektroskopijom, a odgovorna je za tetramerizaciju p53. Ta domena je termodinamski stabilna, pošto je njezina temperatura taljenja (T_m) vrlo visoka ($T_m = 70^\circ\text{C}$), tako da supstitucije jedne aminokiseline u toj domeni ne mogu dovesti do odmotavanja i narušavanja strukture. Također nećemo ju dalje razmatrati.
- 3.2.4** N-terminalna regija bogata prolinom se proteže od 71-93 aminokiseline i povezuje transaktivacijsku i DNA-veznu domenu. Ta regija sadrži deset prolina i zato se još zove poliprolinska regija. Prolini zbog drugačijih konformacijskih svojstva utječu na deformabilitet polipeptidne okosnice što može utjecati na kinetiku smatanja djelujući kao energetska barijera koja odjeljuje dvije domene.

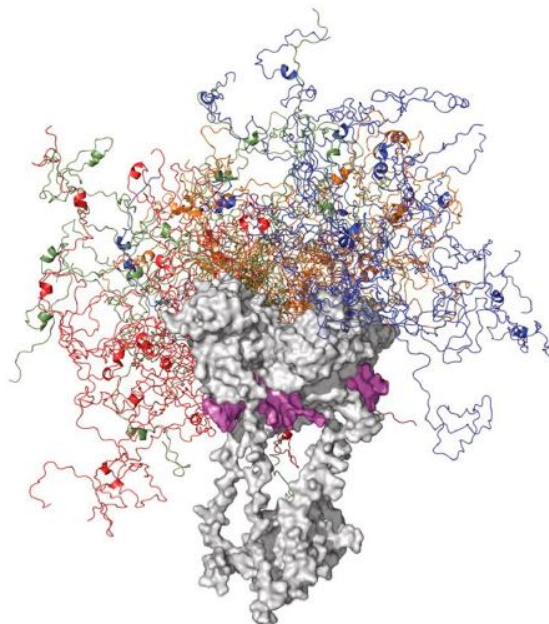
3.2.5 C-terminalna regija bogata prolinom obuhvaća dio proteina od 294-323 aminokiseline i povezuje DNA veznu i tetramerizacijsku domenu. Sadrži sedam prolina i također sudjeluje u smatanju DNA vezne domene.

3.2.6 C-terminalna bazična regija se proteže od 356-393 aminokiseline i kao što joj i samo ime kaže, bogata je bazičnim aminokiselinama. Također je konformacijski fleksibilna kao i N-terminalna transaktivacijska domena.

Iako je jedan od najbolje proučenih proteina, još uvijek nije eksperimentalno određena struktura cijelog proteina. p53 je pravi izazov za strukturne biologe jer je previše neuređen za kristalografiju, a prevelik za analizu NMR-om.

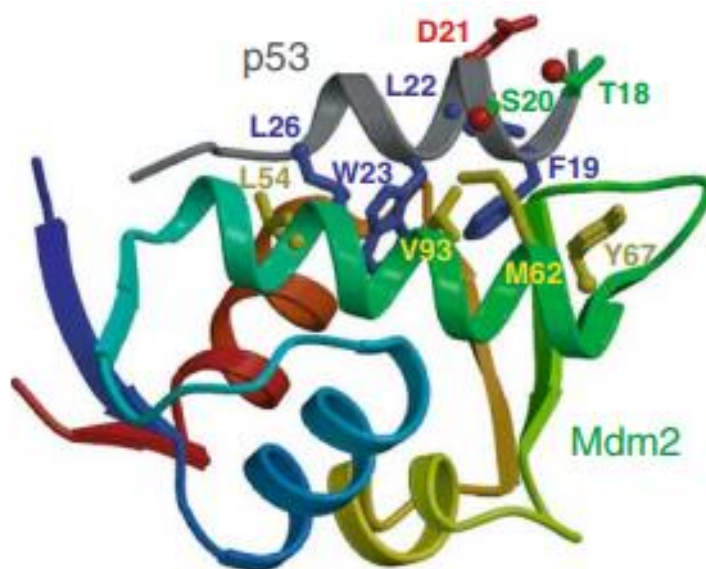
3.3 N-terminalna transaktivacijska domena

Transaktivacijska domena proteina p53 ima barem dvije uloge. Jedna je aktivacija transkripcije, a druga je regulacija funkcije i stabilnosti p53. Zbog svoje intrinzične neuređenosti može zauzeti mnogo konformacija i ima puno veznih partnera, a neki od njih su Mdm2, Mdmx, CBP/p300, Taz2, RPA, TFIIH, Bcl-X1 itd. (Slika 8.).



Slika 8. Slika prikazuje strukturu DNA vezane na prvih 360 aminokiselina proteina p53. DNA je prikazana ljubičastom površinom a DNA vezna domena p53 bijelom površinom. N-terminalne domene različitih mogućih konformacija su prikazane različitim bojama. (Preuzeto iz Uverski i sur. 2016.).

Glavni strukturni motiv koji se pojavljuje kod vezanja ovdje je α -zavojnica proteina p53. Kao primjer opisane su dvije interakcije. Vezna mjesta proteina Mdm2 i CBP/p300 na transaktivacijskoj domeni se preklapaju, a vezanje tih proteina je recipročno i regulirano fosforilacijom. Kad dođe do oštećenja DNA u stanici, određene kinaze fosforiliraju N-terminalnu domenu te se afinitet vezanja p53 za Mdm2 smanjuje, a za p300/CBP povećava. Posljedično dolazi do povećanja količine p53 i njegove povećane transkripcijske aktivnosti. Razlog tome je taj što interakcija p53 sa Mdm2 dovodi do njegove degradacije. Trodimenzionalna struktura N-terminusa p53 vezanog za p300 i CBP još nije asignirana, ali je određena struktura N-terminalnog peptida p53 vezanog za N-terminus Mdm2 proteina, te će ona biti objašnjena ovdje. Struktura obuhvaća regiju od 25-109 aminokiseline humanog Mdm2 vezanog na segment p53 od 15 aminokiselina (15-29). N-terminalni dio tog segmenta nije uređen niti u interakciji i zbog toga nije vidljiv u strukturi, dok je regija od 17-29 aminokiseline uređena i vidljiva u strukturi kao α -zavojnica (Slika 9.).



Slika 9. Struktura kompleksa p53 (15-19) i Mdm2 (25-109) (Preuzeto iz Stavridi i sur. 2005.).

Regija Mdm2 koja veže p53 obuhvaća uređenu domenu koja se sastoji od četiri α -zavojnice povezane sa svake strane β -pločama, te čini duboki hidrofobni utor u koji se veže α -zavojnica p53. Interakcije koje omogućuju vezanje su uglavnom hidrofobnog karaktera i uključuju aminokiseline Phe19, Trp23 i Leu26 proteina p53 sa brojnim hidrofobnim bočnim ograncima Mdm2 proteina od kojih su najznačajniji Leu54, Met62, Tyr67 i Val93, koji oblažu površinu

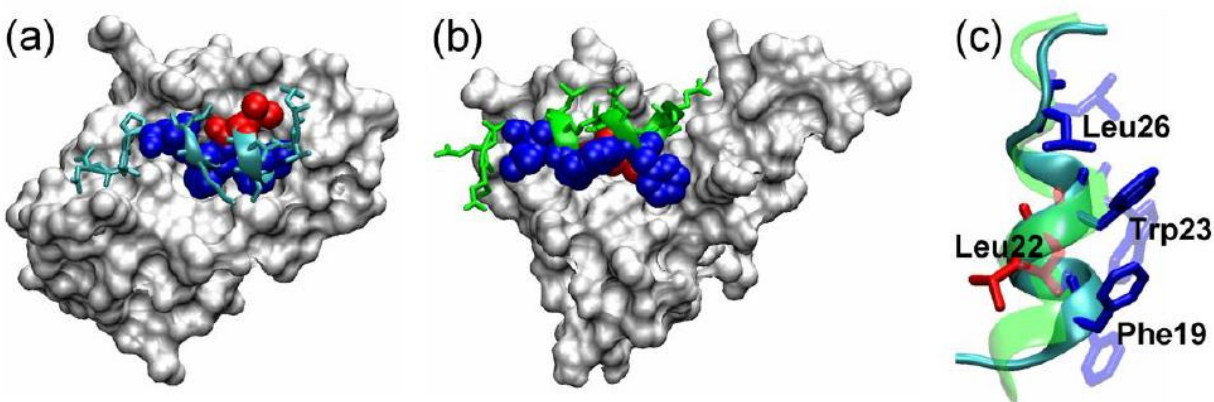
utora Mdm2. Zavojnica p53 je amfipatska, tako da hidrofobna strana interagira s Mdm2 a hidrofilna je izložena otapalu, što je ključno za pravilnu interakciju.

Struktura kompleksa p53-Mdm2 objašnjava kako fosforilacije različitih bočnih ogranaka mogu smanjiti afinitet vezanja dvaju proteina. Hidroksilna grupa Ser20 p53 se nalazi blizu Met62 Mdm2 proteina, tako da njegova fosforilacija dovodi do steričkog preklapanja između ta dva bočna ogranka. Također se negativno nabijena fosfatna skupina nalazi neposredno do hidrofobnog bočnog ogranka metionina što je energetski nepovoljno. S druge strane, hidroksilna skupina Tyr18 ostvaruje vodikovu vezu s karboksilnom skupinom Asp21. Ta interakcija je važna jer stabilizira amfipatsku α -zavojnicu proteina p53, te bi fosforilacija hidroksilne skupine Tyr18 dovela do njezina narušavanja. Također, na strukturi je vidljivo da fosforilacija Ser15 vjerojatno nema neposredan utjecaj na interakciju između Mdm2 i p53, ali pretpostavlja se da bi mogla imati utjecaja *in vivo* jer povećava afinitet vezanja p53 za p300 i CBP koji kompetiraju vezanju Mdm2.

Također struktura p53-Mdm2 objašnjava kako određene supstitucije aminokiselina mogu smanjiti afinitet vezanja dva proteina. Supstitucije koje zamjenjuju Leu22 i Trp23 proteina p53 s Gln i Ser narušavaju interakciju sa Mdm2 proteinom. Amfipatska zavojnica proteina p53 čini samo mali dio transaktivacijske domene, te je eksperimentalno dokazano da navedene supstitucije nisu dovoljne da poremete vezanje proteina p53 na druge proteine, što upućuje na to da transaktivacijska domena uključuje još neke ili možda mnogo elemenata s kojima može ulaziti u interakcije sa drugim veznim partnerima. Upravo konformacijska fleksibilnost transaktivacijske domene omogućuje brojna inducirana pristajanja koja mu omogućuju specifično vezanje brojnih drugih veznih partnera što je karakteristika intrinzično neuređenih proteina. Također, ona omogućuje pristajanje te domene u aktivna mjesta različitih modificirajućih enzima kao što su kinaze i acetilaze, a to je razlog zašto transaktivacijska domena može biti modificirana na mnogo načina. Te modifikacije ili kombinacije modifikacija tada mogu favorizirati određene interakcije s određenim transkripcijskim faktorima i regulirati funkciju samog p53 proteina ili tih liganda.

Drugi protein s kojim interagira N-terminalna domena proteina p53 je Taz2 koji je zapravo domena transkripcijskog faktora CBP koji sudjeluje u interakcijama s brojnim drugim transkripcijskim faktorima u stanici. Interakcija s Taz2 proteinom se znatno razlikuje od one s

Mdm2 (Slika 10.). Samo ogranak Leu22 proteina p53 je insinuliran u utor Taz2. Strukturna istraživanja su pokazala da u tom kompleksu N-terminalna domena p53 koristi različitu površinu iste α -zavojnice od one u p53-Mdm2 kompleksu, te da je zavojnica rotirana za oko 90°, tako da su aminokiseline koje su u p53-Mdm2 kompleksu smještene u utoru Mdm2 proteina, ovdje izložene otapalu. Istraživanja su također pokazala da konformacije postranih bočnih ogranaka; Phe19, Leu22, Trp23 i Leu26 u kompleksu s Mdm2 imaju drugačiju konformaciju nego u kompleksu sa Taz2.

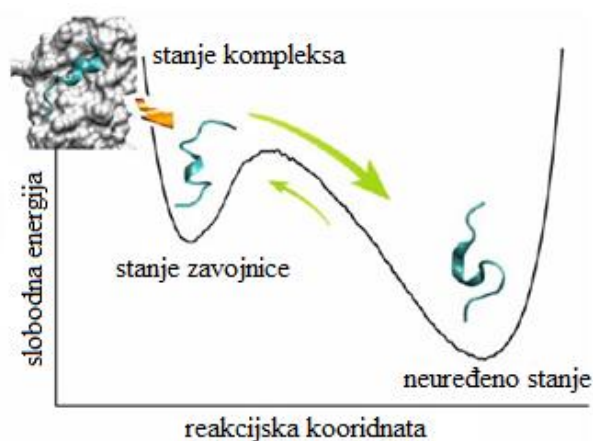


Slika 10. Struktura α -zavojnice N-terminalne domene u a) p53-Taz2 kompleksu i b) p53-Mdm2 kompleksu. Mdm2 i Taz2 su prikazani površinama bijele boje. α -zavojnica p53 je prikazana svjetlo plavom bojom u kompleksu sa Taz2 i zelenom u kompleksu sa Mdm2. Phe19, Trp23 i Leu26 su prikazani kalotnim modelom plave boje na slici a) i b), a Leu22 crvenom bojom, c) usporedba prostornog položaja α -zavojnice p53 u kompleksu sa Taz2 (svjetlo plavo) i Mdm2 (zeleno). (Preuzeto iz Huang i sur. 2011.).

3.4 α -zavojnica N-terminalne domene proteina p53

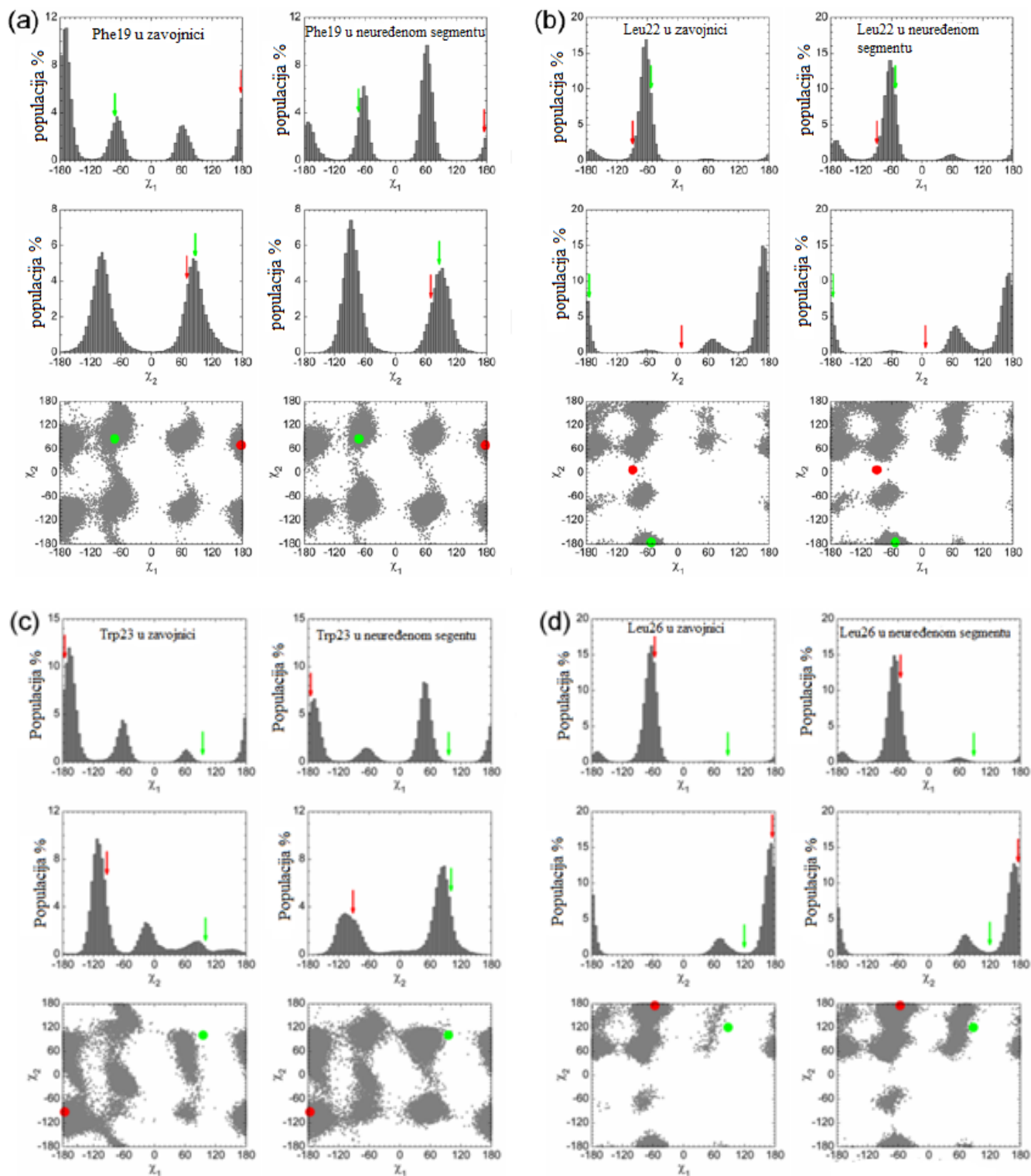
Iako N-terminalna domena p53 pokazuje veliku konformacijsku fleksibilnost u otopini, neka istraživanja pokazuju da regija Thr18-Leu26 formira privremeno stabilnu α -zavojnicu već u otopini koja se u potpunosti stabilizira u kompleksima s Mdm2 i Taz2 proteinom. Slobodna energija stanja α -zavojnice je veća od neuređenog stanja tog segmenta, i zato se ona pojavljuje samo privremeno i u malom dijelu populacije slobodnih proteina p53. Energetska barijera prijelaza te sekundarne strukture u neuređenu, kada protein nije u kompleksu, je manja od energetske barijere smatanja (Slika 11.). Međutim, ne postoje dokazi da postoji ravnoteža dviju populacija p53 u otopini između neuređenog i uređenog stanja Thr18-Leu26 segmenta, ali

dokazano je da postoji očuvanost konformacije određenih bočnih ogranaka prije i nakon interakcije.

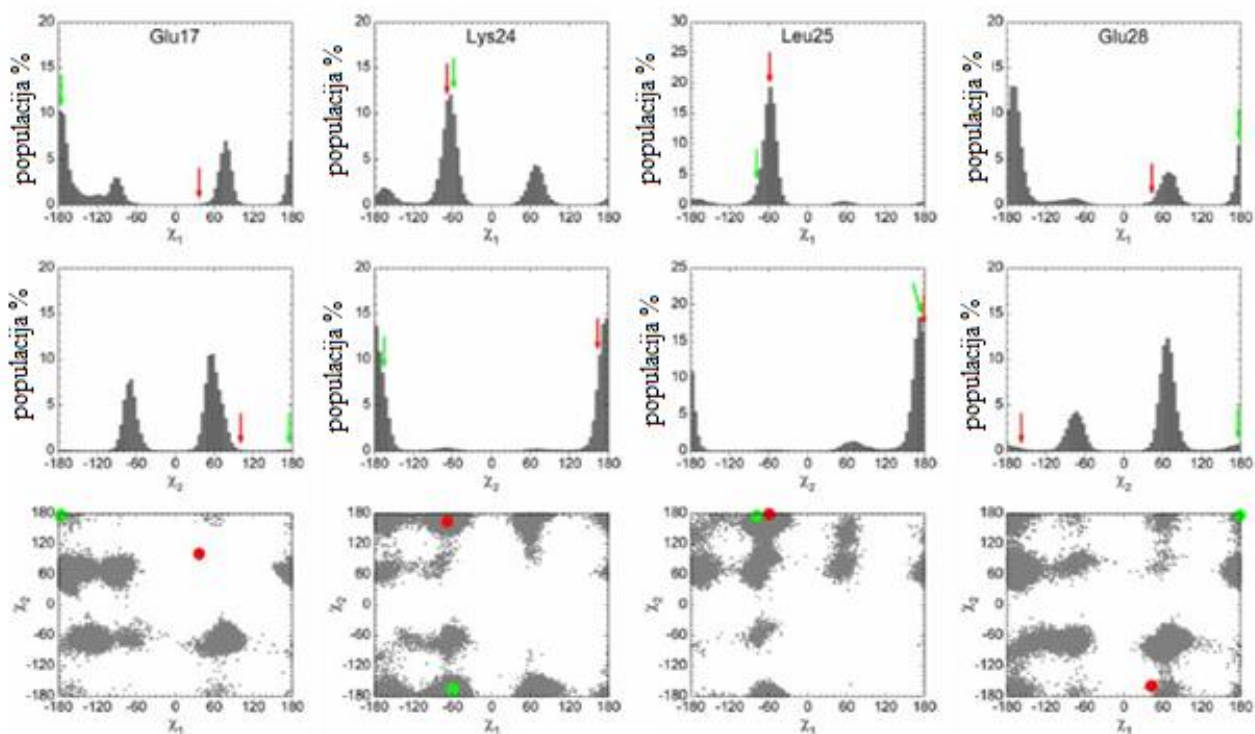


Slika 11. Energetski dijagram smatanja segmenta p53 od 17-29 aminokiseline. (Preuzeto i prilagođeno iz Huang i sur. 2011.).

Istraživanja su pokazala da bočni ogranci određenih aminokiselina važnih za interakciju u slobodnom stanju, odnosno u otopini, imaju istu konformaciju kao u vezanom stanju, odnosno u kompleksu, neovisno o tome je li taj segment u uređenom ili neuređenom stanju u otopini. Također, formiranje strukture zavojnice u otopini povećava udio konformacija vezanog stanja određene aminokiseline, tako zvanih veznih rotamera. Na primjer, u p53-Mdm2 kompleksu, kutevi χ_1 i χ_2 aminokiseline Phe19 iznose 177° i 71° . Prilikom prelaska iz neuređenog stanja u α -zavojnicu, populacija molekula s tim rotamerom se poveća tri puta (sa 19,2% na 59,5%). Slične promjene se događaju i s ostalim aminokiselinama koje sudjeluju u interakciji, ali u različitoj mjeri. Na primjer, Leu22 i Leu26 pokazuju isti fenomen povećanja postotka rotamera karakterističnog za kompleks prijelazom u uređeno stanje, ali u manjoj mjeri, dok je za Trp23 ipak taj fenomen izraženiji (slika 12). Aminokiseline koje ne ulaze direktno u interakciju pokazuju drugačiji trend. Simulacije pokazuju da su vezne konformacije Glu17 i Glu28 zastupljene u vrlo malom postotku u slobodnoj zavojnici u otopini ili u neuređenom stanju u otopini (Slika 13.). Te aminokiseline zauzimaju svoju veznu konformaciju prilikom vezanja za Mdm2/Taz2, inducirano nastankom kompleksa. S druge strane, vezne konformacije Lys24 i Leu25 su zastupljene u većem postotku u neuređenom nevezanom stanju u odnosu na Glu17 i Glu28 a populacija im se znatno poveća prelaskom u tranzijentnu α -zavojnicu.



Slika 12. Konformacijska analiza bočnih ogranaka nekih aminokiselina koje sudjeluju u interakciji sa Mdm2 i Taz2 u nevezanom stanju uređenog α -heliksa i neuređene strukture. Konformacije u vezanom stanju u p53N-Mdm2 i p53N-Taz2 kompleksu su označene crvenim, odnosno zelenim oznakama (Preuzeto i prilagođeno iz Huang i sur. 2011.).



Slika 13. Konformacijska analiza bočnih ogranaka aminokiselina koje ne sudjeluju direktno u interakciji, u stanju zavojnice. Konformacije u vezanom stanju u p53N-Mdm2 i p53N-Taz2 kompleksu su označene crvenim odnosno zelenim oznakama (Preuzeto i prilagođeno iz Huang i sur. 2011).

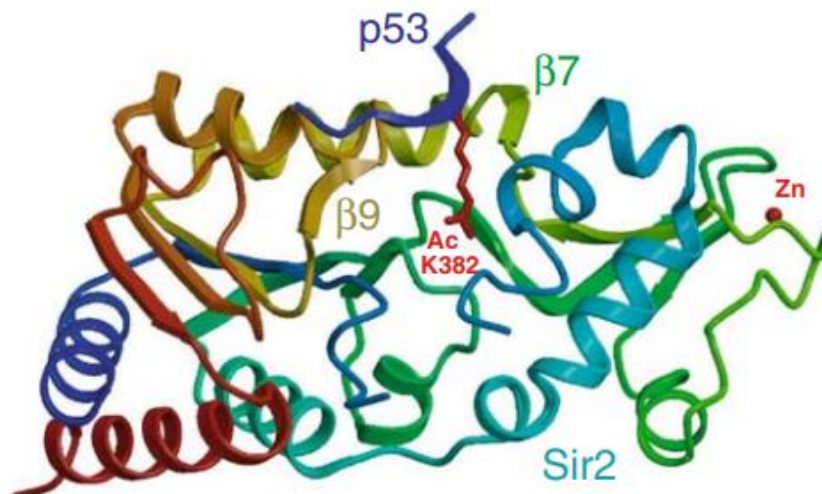
U nevezanom stanju, N-terminalna regija p53 je vrlo fleksibilna, međutim, prije same interakcije, tranzijentno formiranje α -zavojnice uzrokuje prijelaz konformacija ključnih aminokiselina u one konformacije koje su prisutne u vezanom stanju i potiče vezanje. Ostale aminokiseline koje ne sudjeluju direktno u ostvarivanju kontakta između dva proteina prelaze u svoje odgovarajuće konformacije tek na poticaj vezanja, odnosno inducirano, što omogućuje stvaranje rijetkih rotamera koji se ne pojavljuju u slobodnom stanju, a fenomen se zove inducirano pristajanje. Dakle, smatra se da određene aminokiseline ključne za interakciju, u intrinzično neuređenim proteinima imaju preferentne konformacije i u nevezanom stanju, važne za njihovu funkciju u kompleksu. U procesu vezanja p53 na Mdm2, vezanje je potaknuto i započinje susretanjem tranzijentne α -zavojnice p53 i Mdm2 proteina što dovodi do nastanka prijelaznog predkompleksa. Insercija bočnih ogranaka aminokiselina; Phe19, Trp23 i Leu26 u pravilnoj konformaciji u utor Mdm2, stabilizira kompleks. Nadalje, dolazi do smatanja okosnice i do induciranog pristajanja ostalih aminokiselina što dovodi do nastanka stabilnog nativnog kompleksa. Dakle u procesu vezanja između intrinzično neuređenog proteina i njegove mete, u početnoj fazi dolazi do

konformacijske selekcije, prilikom koje samo proteini koji imaju ključne aminokiseline u pravilnoj konformaciji u tom trenutku mogu stupiti u interakciju i stvoriti predkompleks. Nakon nastanka predkompleksa slijedi inducirano pristajanje. Moguće je da aminokiseline koje sudjeluju u interakciji imaju konformacije u slobodnom stanju koje odgovaraju konformacijama njihove odgovarajuće mete, i da određena meta selektira određenu grupu aminokiselina u procesu vezanja.

3.5 C-terminalna bazična regija

Još jedna regija proteina p53 koja pokazuje konformacijsku fleksibilnost u otopini i koja je podložna brojnim posttranslacijskim modifikacijama je C-terminalna bazična regija. Kao što joj samo ime kaže, bogata je aminokiselinama s bazičnim bočnim ograncima te ima karakteristike N-terminalnih repova histona što ju čini podložnom sličnim modifikacijskim enzimima koji modificiraju i histone, kao što su kinaze i acetilaze, koje utječu na aktivnost proteina p53. Određene modifikacije omogućuju vezanje specifičnih transkripcijskih koaktivatora, najčešće acetiltransferaza, koje modificiraju i samu C-terminalnu regiju ali i repove histona u blizini DNA sekvence na koju je p53 vezan, i na taj način mogu potaknuti ekspresiju određenih gena. C-terminalna bazična regija interagira sa mnoštvom proteina uključujući 13-3-3, GSK3 β , hGcn2, PARP-1, TAF, TAF1, TRAP ali ovdje je opisana u kompleksu s dva proteina; Sir2 koji je deacetilaza, i S100B, protein koji veže kalcij. Ovdje također imamo model induciranog pristajanja, tako da C-terminalna domena poprima konformaciju koja je kompatibilna veznim mjestima proteina Sir2 i S100B a obje te konformacije se međusobno u potpunosti razlikuju.

Dokazano je da deacetilaza Sir2, osim deacetilacije histona i utišavanja transkripcije, također deacetilira C-terminalnu domenu p53. Riješena je struktura humanog p53 proteina sa acetiliranim Lys328 u kompleksu sa arhealnim Sir2 proteinom (Slika 14.). U tom kompleksu sudjeluju bočni ogranci 379-387 proteina p53 koji poprimaju konformaciju β -lanca i zajedno sa dva β -lanca proteina Sir2 gradi trolančanu β -ploču. Iznenadjuće je da su sve interakcije ta dva proteina, osim acetiliranog lizina, neovisne o aminokiselinskoj sekvenci proteina p53, već su to uobičajene interakcije u kojima sudjeluju samo atomi peptidne okosnice kao u svakoj β -ploči.

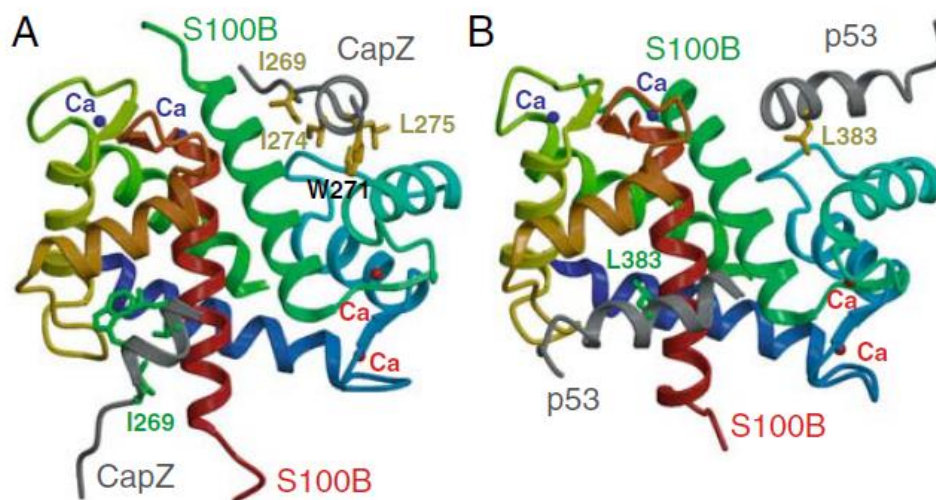


Slika 14. C-terminalni dio p53 (379.-387.) u kompleksu sa Sir2 (Preuzeto iz Stavridi i sur. 2005.).

Struktura upućuje na to da enzim Sir2 može deacetilirati bilo koji acilirani peptid što je i potvrđeno daljnjim eksperimentima, tako da specifičnost Sir2 za određeni protein pa tako i p53 mora biti posredovana nekim specifičnijim interakcijama dijelova proteina dalje od mjesta interakcije, ione nisu prikazane na slici.

Drugi kompleks čija struktura je riješena je p53-S100B. S100B pripada EF obitelji proteina koji vežu kalcij, a ona uključuje poznate proteine kao što su kalmodulin i troponin. Članovi te obitelji proteina mijenjaju konformaciju vezanjem kalcija i na taj način odgovaraju na promjene koncentracije kalcija u stanici. Puno članova te obitelji proteina su vezani uz različite funkcije citoskeleta kao što je dinamika aktinskih filamenata. Trodimenzionalna struktura proteina S100B je riješena bez i sa vezanim kalcijem i pokazuje da on djeluje kao homodimer, pri čemu je svaka podjedinica građena od četiri α -zavojnice. Prilikom vezanja kalcija na protein, dolazi do konformacijske promjene zavojnice broj 3 te ona promjeni orijentaciju tako da izloži dio hidrofobnih bočnih ogranka koji služe za vezanje i interakciju s različitim drugim proteinima, kao što je CapZ protein i p53. Vezanje proteina S100B na p53 je otkriveno prilikom proučavanja fosforilacije C-terminalne bazične regije p53 uzrokovano promjenom koncentracijom kalcija i s kinazom PKC. Struktura je riješena NMR-spektroskopijom. U toj interakciji p53 također poprima helikalnu konformaciju, pri čemu je samo jedan hidrofobni bočni ogranak proteina p53, Leu383, vezan u hidrofobni utor proteina S100B (Slika 15.). Dakle, vezanje intrinzično

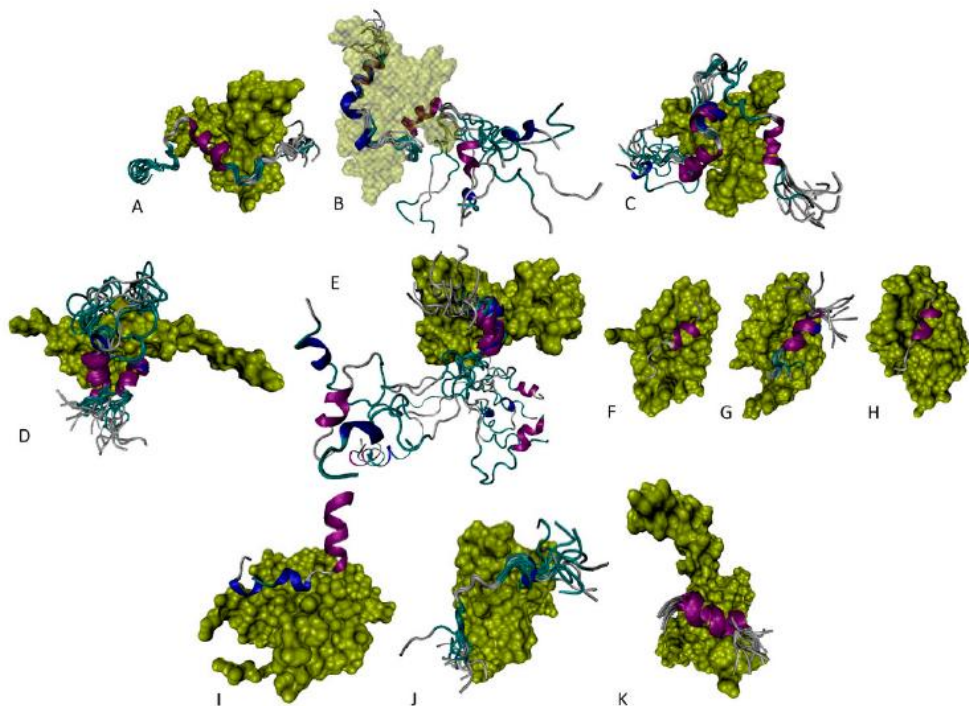
neuređenih proteina može biti potaknuto promjenom konformacije mete na neki vanjski poticaj, kao što je promjena koncentracije kalcija ili nekog drugog glasnika.



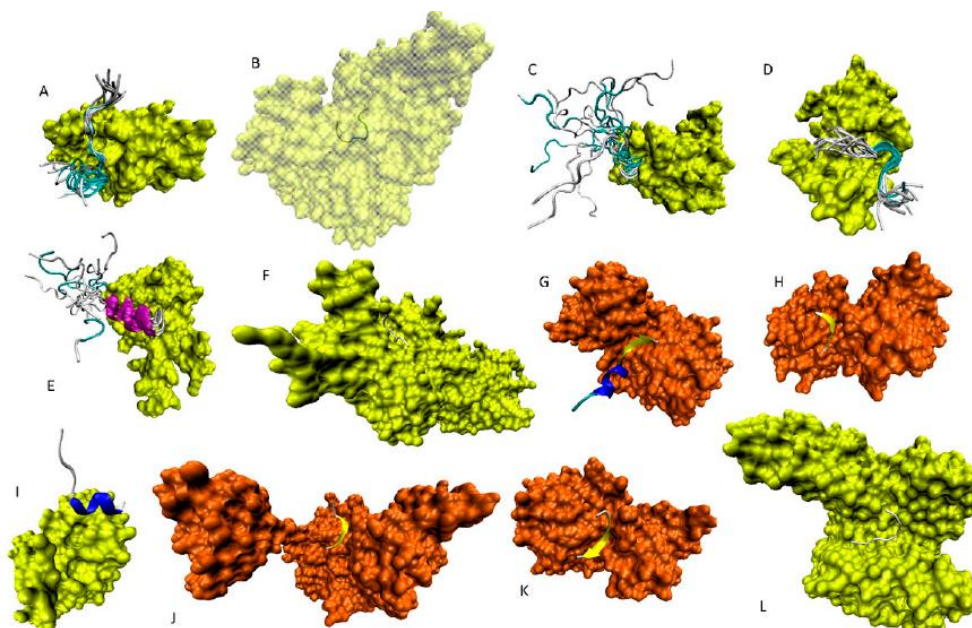
Slika 15.Struktura kompleksa S100B-CapZ (A.) i S100B-p53 (B.) (Preuzeto iz Stavridi i sur. 2005.).

3.6 Proteoforme proteina p53

Kompleksi p53 sa drugim proteinima utječu na konformacijska svojstva okolnih dijelova proteina p53. Dakle, originalna konformacijska proteoforma je podložna strukturnim promjenama koje su posljedica interakcija sa specifičnim partnerima, pri čemu svaki partner inducira zauzimanje jedinstvene i specifične konformacije ili skupa određenih konformacija. Slika 16. prikazuje nekoliko kompleksa različitih fragmenata N-terminalne domene p53 i moguće konformacije koje ostatak p53 može zauzeti nakon interakcije. Isto vrijedi i za C-terminalnu domenu koja u kompleksu s različitim proteinima daje različit skup konformacija N-terminalnog kraja C-terminalne domene (slika 17). Ona može poprimiti različite nepravilne strukture, konformacije i dinamiku koja znatno ovisi o veznom partneru. I centralni dio C-terminalne domene pokazuje značajnu strukturnu raznolikost u vezanom stanju i poprima više konformacija. Može biti u stanju β -ploče kao u kompleksu sa 376-388 Sir2 acetilazom, ili zavojnice kao u kompleksu sa P53BP1. Takve specifične konformacije nastale kao posljedica interakcije mogu stvarati proteoforme različite biološke funkcije u stanici i proširiti spektar djelovanja proteina.



Slika 16. Konformacije N-terminalne regije p53 pri vezanju na različite vezne partnere prikazane žutim površinama (A) 2K8F, (B) 5HOU, (C) 5HPD, (D) 2L14, (E) 2LY4, (F) 1YCR, (G) 2MWY, (H) 3DAC, (I) 2B3G, (K) 2GS0 (Preuzeto iz Uverski i sur. 2016.).

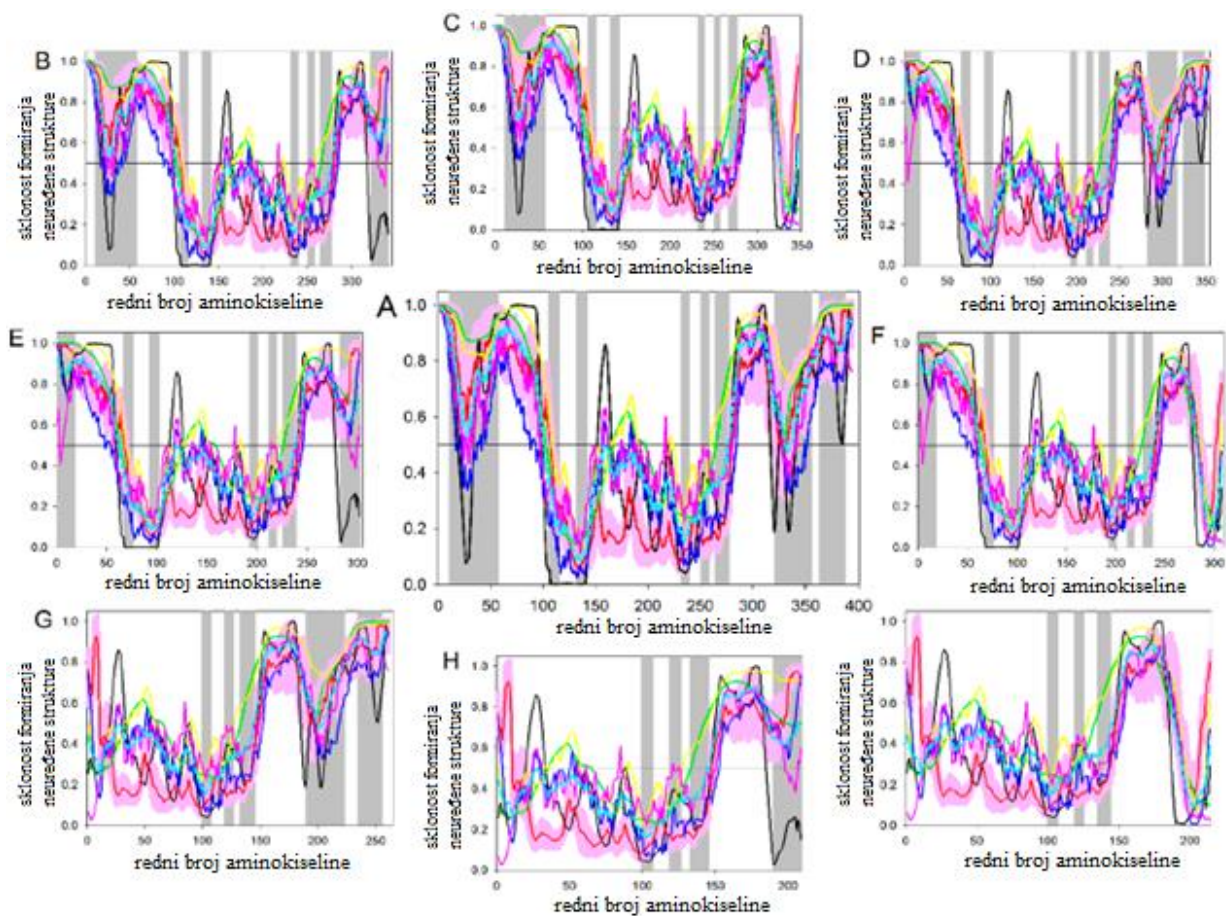


Slika 17. Konformacije C-terminalne regije vezane na različite vezne partnere; (A) 2MWO, (B) 3TG5, (C) 1JSP, (D) 2MWP, (E) 1DT7, (F) 1XQH, (G) 1YC5, (H) 4BV2, (I) 4X34, (J) 4ZZJ, (K) 4BUZ, (L) 3LW1 (Preuzeto iz Uverski i sur. 2016.).

Također, alternativno prekrajanje, korištenje alternativnih promotora i alternativna inicijacija translacije *TP53* gena, koji je građen od 11 eksona, može dati mnoštvo različitih izoformi različitih funkcija. Te izoforme mogu biti značajne iz razvojnog i patološkog aspekta jer različite izoforme mogu biti različito eksprimirane u stanicama tumora u odnosu na normalno tkivo, ali i u odnosu na ostale tumore. Osim različite razine ekspresije tih varijanti u pojedinim tipovima tumora, one mogu imati i specifične funkcije. Neke izoforme mogu utjecati na ekspresiju i aktivnost drugih, te na taj način utjecati na cijelu mrežu proteinskih interakcija u stanici. Na primjer del40P54 izoforma koja nastaje alternativnim prekrajanjem introna 2, nema prvih 39 aminokiselina i zbog toga joj nedostaje vezno mjesto za Mdm2 protein. Posljedično dolazi do promjene omjera koncentracija različitih proteoformi p53 zbog toga jer del40P54 ne može toliko efikasno aktivirati transkripciju normalnog p53, ali može stvoriti kompleks s njime pri čemu smanjuje njegovu koncentraciju što dovodi do proliferacije stanica. Ukratko, stanica koristi različite mehanizme kontrole genske ekspresije kako bi regulirala koncentraciju različitih izoformi p53 sa različitim funkcijama.

Također različite proteoforme nastale ovim mehanizmima mogu imati značajnu ulogu u karcinogenezi jer abnormalna ekspresija različitih proteoformi može dovesti do nastanka različitih tumora. Na primjer, normalno tkivo dojke eksprimira tri izoforme p53: p53 α , p53 β i p53 γ , dok u tkivu tumora dojke ekspresija p53 β i p53 γ je smanjena za 60% a povećana je ekspresija izoforme del133p53.

Alternativno prekrajanje primarno zahvaća regije intrinzične neuređenosti (Slika 18.). Profili neuređenosti različitih proteina se značajno mijenjaju alternativnim prekrajanjem. Različite izoforme nastale prekrajanjem nemaju dijelove N-terminalne i C-terminalne neuređene domene, ili kombinaciju obje, i zbog toga im je smanjen stupanj neuređenosti u odnosu na normalnu formu p53 (slika 18). Također, pošto su te domene glavne za interakciju s drugim proteinima, veći dio interakcija više nije moguć u različitim proteoformama što može dovesti do promjene interaktoma u stanicama različitih tkiva ovisno o proteoformama koje ta stanica eksprimira.

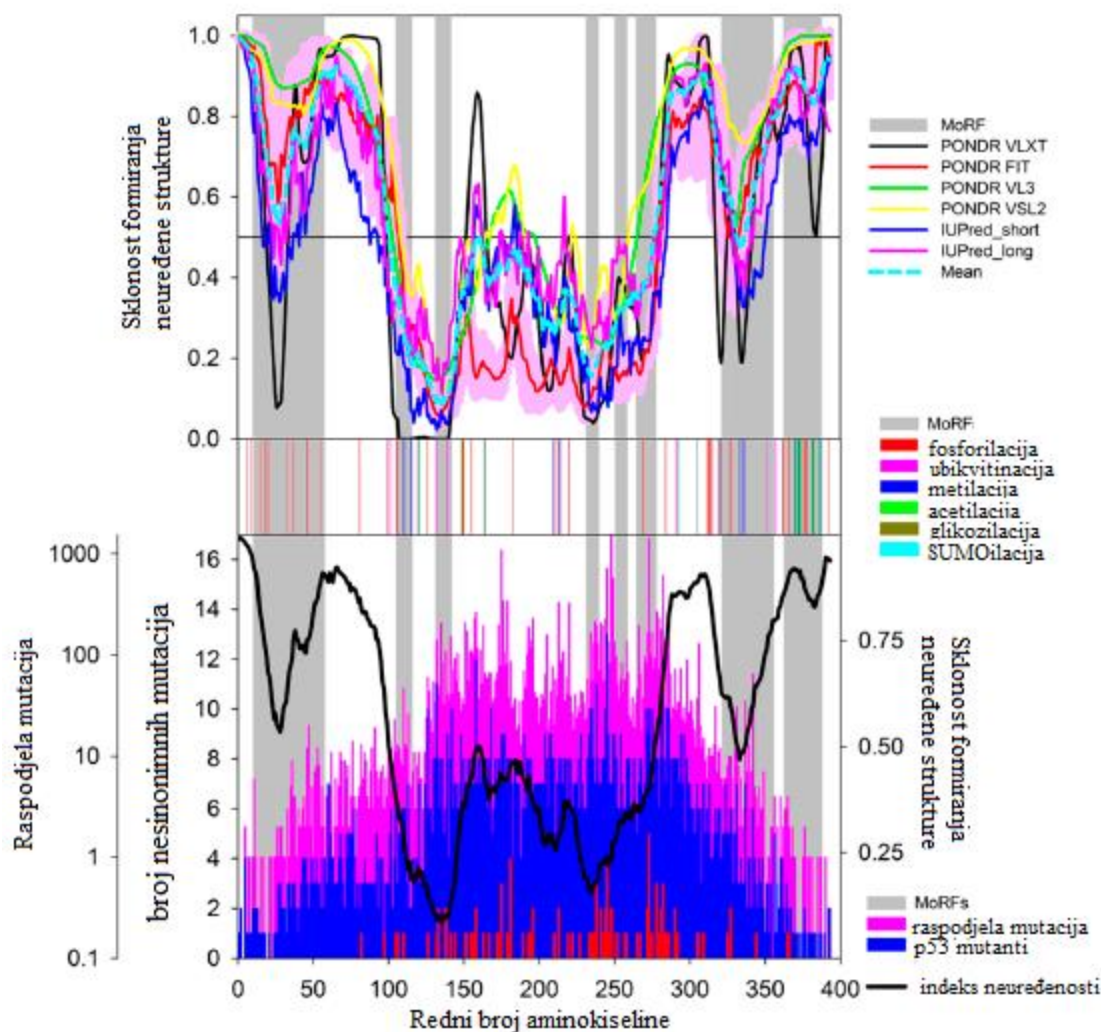


Slika 18. Analiza stupnja intrinzične neuređenosti različitih varijanti nastalih alternativnim prekrajanjem; (A) p53 α , (B) p53 β , (C) p53 γ , (D) del40p53 α , (E) del40p53 β , (F) del40p53 γ (G) del133p53 α , (H) del133p53 β , (I) del133p53 γ (Preuzeto i prilagođeno iz Uverski i sur. 2016.).

Također p53 je podložan brojnim posttranslacijskim modifikacijama koje mogu značajno promijeniti konformabilitet proteina, odnosno spektar konformacija koje isti može poprimiti. Do sada je utvrđeno da 60 od 393 aminokiseline mogu biti posttranslacijski modificirane. Modifikacije uključuju acetilacije, ADP ribozilacije, oksidacije cisteina i metionina, alkilacije, glikozilacije, metilacije, nitrilacije, fosforilacije, sumoilacije, ubikvitinacije i još neke, a zahvaćaju najčešće intrinzično neuređenu N-terminalnu i C-terminalnu domenu koje su uključene u većinu interakcija i zbog toga imaju važnu ulogu u regulaciji aktivnosti p53. Mnoge modifikacije su ovisne jedna o drugoj i određene modifikacije određuju slijed nastanka drugih modifikacija jer stvaraju specifična vezna mjesta za sljedeći modificirajući enzim što može dovesti do vrlo kompleksnih i neočekivanih ishoda. Na taj način, nastanak određenih modificiranih proteoformi p53 može utjecati na nastanak drugih proteoformi. To čini

postranslacijske modifikacije važnim izvorom strukturne i funkcionalne heterogenosti proteoformi p53. Različite modifikacije imaju različite uloge u regulaciji stabilnosti p53 te u regulaciji interakcija sa drugim proteinima i DNA. Također sve te modifikacije su reverzibilne što daje još kompleksniju sliku u stanici.

Treći i najbogatiji izvor proteoformi specifičnih za određene stanice su mutacije gena za p53. Gen *TP53* je gen koji je najčešće mutiran od svih u stanicama tumora. Te mutacije najčešće dovode do njegove inaktivacije ili promijenjene funkcije, a zastupljene su u više od 50% sporadičnih tumora. Najčešće su supstitucije aminokiselina uslijed promjene kodona. Insercije i delecije mogu dovesti do pomaka okvira čitanja i nastanka skraćenih proteoformi koje su često nefunkcionalne. Mutacije p53 mogu biti somatske i tad uzrokuju sporadične tumore ili generativne koje se nasljeđuju na potomstvo dovodeći do familijarnih tumora. Somatske mutacije su zastupljene gotovo u svakom tipu tumora, a javljaju se u 50% u tumora jajnika, kolorektalnih i ezofagealnih tumora. Obično postoje područja u genu p53 koja su podložnija kancerogenim mutacijama koje zovemo „*hot spot*“ mjesta. Ružičasto područje (slika 19.) prikazuje raspodjelu tumorogenih mutacija unutar sekvence p53. Vidljivo je da se većina mutacija događa u centralnoj uređenijoj regiji koja veže DNA, ali sve aminokiseline su podložne mutacijama. Zbog toga su mutacije najbogatiji izvor proteoformi proteina p53. Te proteoforme pokazuju zaista ogromnu funkcionalnu i strukturalnu varijabilnost koje ne samo da mogu utišati normalne funkcije p53 nego mogu stvoriti neomorfne proteoforme koje imaju neku novu aktivnost.



Slika 19. (A) Distribucija sklonosti formiranja intrinzične neuređenosti duž sekvence p53, (B) mjesta posttranslacijskih modifikacija, i (C) zastupljenost pojedinih patoloških mutacija duž sekvence proteina p53. (Preuzeto i prilagođeno iz Uverski i sur. 2016.).

Naravno, svi faktori koji dovode do nastanka posebnih proteoformi (alternativno prekrajanje, posttranslacijske modifikacije i mutacije) mogu djelovati kombinirano i povećati strukturnu i funkcionalnu heterogenost proteina p53 i stvarati mnoštvo novih i kompleksnijih proteoformi. Na primjer, neka mutacija može maknuti aminokiselinu koja je podložna posttranslacijskoj modifikaciji kao što je fosforilacija, ili može biti fosforilirana neka nova aminokiselina koja je zamijenila prethodnu. To pak može utjecati na cijeli uzorak drugih posttranslacijskih modifikacija u proteinu, ili može dovesti do nastanka kompleksa s novim veznim partnerima. Na primjer, fosforilacija posredovana RAS proteinom Arg280Lys mutanta p53 na Ser6 i Ser9

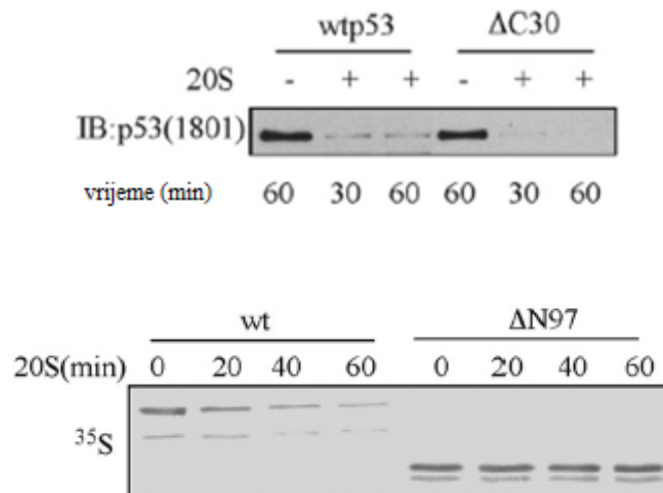
promovira interakciju sa Smad proteinom i nastankom kompleksa koji inhibira antimetastaznu aktivnost proteina p53. Mutacije Ser15 i Ser46 na N-terminalnoj regiji p53 su odgovorne za varijabilni odgovor na tretman zračenja kod tumora raka.

Dakle, p53 postoji kao skup različitih proteoformi koje nastaju brojnim mehanizmima, počevši od same intrinzične neuređenosti njegove N-terminalne i C-terminalne domene koje daju bazične konformacijske proteoforme, preko interakcija s brojnim veznim partnerima koje stvaraju cijeli spektar funkcionalno različitih proteoformi, do alternativnog prekrajanja, korištenja alternativnih promotora i alternativne inicijacije translacije koje stvaraju mnoštvo opet novih i drugačijih proteoformi. Svaka od njih može biti postranslacijski modificirana na različite načine i na barem 60 aminokiselina u proteinu, na više mjesta odjednom, i višestruko i reverzibilno dovodeći do mnoštva novih proteoformi. I na posljétku 96% aminokiselina gena p53 može biti mutirano stvaranjem mutanata s različitim strukturama i funkcijama. Sve te forme mogu dati bezbroj kombinacija samo jednog jedinog proteina, p53.

3.7 Kontrola degradacije p53 preko N-terminalne domene

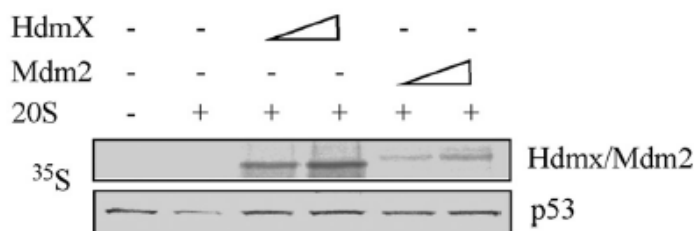
Količina p53 u stanici a time i aktivnost su velikim dijelom regulirane njegovom degradacijom. Ona može biti ovisna o ubikvitinu ili neovisna. Kod intrinzično neuređenih proteina, upravo neuređene regije su meta prepoznavanja enzimima koji vrše ili šalju protein na degradaciju. Glavno mjesto prepoznavanja za degradaciju p53 je intrinzično neuređena N-terminalna domena. Važnu ulogu u tome imaju i interakcije te regije s drugim proteinima, kao što je već spomenuti Mdm2. Mdm2 je protein koji, kad se veže na N-kraj p53, rezultira ubikvitinacijom p53 na C-kraju i šalje ga dalje na degradaciju. S druge strane, interakcija s nekim drugim proteinima može dovesti do sprečavanja degradacije. Interakcija s Hdmx djeluje kao represor za degradaciju i stabilizira razinu p53 kompetirajući za vezno mjesto sa Mdm2. Ali u kompleksu Hdmx-p53, p53 je neaktivan. Protein p53 je degradiran pomoću 20S proteasoma *in vitro* i *in vivo*. Mutanti bez zadnjih 30 aminokiselina C-terminalne regije (delC30) ne pokazuju razliku u degradaciji u odnosu na divlji tip proteina (Slika 30.). Također izolirana C-terminalna regija (CT-(311-393)) je također u potpunosti razgrađena proteosomom, što sugerira da C-kraj nije odgovoran za podložnost p53 na degradaciju 20S proteasomom. Međutim, mutanti u kojima

je deletirana N-terminalna regija (delN97p53-(97-393) su otporni na 20S proteasomalnu degradaciju, što dokazuje da je N-terminalna regija ključna za degradaciju proteasomom.



Slika 20. Prikaz podložnosti p53 degradaciji 20S proteasomom na SDS gel elektroforezi. Prikazani su divlji tip (wtp53), mutant sa deletiranih 30 aminokiselina na C-kraju (delC30) na gornjem gelu u kojem se prati prisutnost proteina u odsutnosti i prisutnosti 20S u različitim intervalima i delecijски mutant na N-kraju (delN97) na donjem gelu gdje se prati njegova podložnost degradaciji. (Preuzeto i prilagođeno iz Tsvetkov i sur. 2009.).

Točna uloga N-krajap53 u procesu degradacije je nepoznata, ali se smatra da od njega počinje degradacija. Također vezanje proteina na N-kraj može zaštititi p53 od degradacije. Mdm2 i Hdmx dijele vrlo sličnu primarnu strukturu i oba se vežu na N-kraj p53, pri čemu inhibiraju degradaciju 20S proteasomom (Slika 21.), međutim vezanje na Mdm2 potiče neke druge mehanizme degradacije koji nisu prikazani ovdje.



Slika 21. Podložnost degradaciji p53 i u kompleksu sa Hdmx i Mdm2 20S proteasomom prikazano na SDS gel elektroforezi. Plus i minus prikazuju prisutnost, odnosno odsutnost određene komponente u in vitro sustavu. (Preuzeto iz Tsvetkov i sur. 2009.)

N-kraj p53 je podložan posttranslacijskim modifikacijama od kojih su najzastupljenije fosforilacije koje provode kinaze inducirane staničnim stresom, kao što je oštećenje DNA. Te modifikacije znatno smanjuju afinitet p53 za Mdm2 kao što je bilo opisano u prethodnom poglavlju i štite ga od degradacije. Smatra se da puno intrinzično neuređenih proteina ima svoje partnere koji ih čine stabilnima u stanici kad uđu u kompleks. Takve proteine zovemo „dadilje“. Oni održavaju koncentraciju određenog regulatora stabilnom kada je to potrebno, odnosno u odgovoru na neki okolišni stimulans. Na taj način proteini mogu izbjeći degradacijsku mašineriju, barem dovoljno dugo da izvrše svoju biološku funkciju ali ipak takvi proteini imaju kraće poluvrijeme života od proteina koji su smotani u dobro definirane strukture. Takvo skraćeno vrijeme polужivota predstavlja komponentu regulacije i lakši odgovor na promjenu okolišnih signala zbog brže promjene koncentracije regulatora u stanici. Time se postiže osjetljivost i mogućnost brzog odgovora na promjenu okolišnih uvjeta i uvjeta u stanici.

4. LITERATURA

1. Uverski N. V.; p53 Proteoforms and Intrinsic Disorder: An Illustration of the Protein Structure–Function Continuum Concept. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016.
2. Huang Y.; Liu Z.; The expanding view of protein-protein interactions: complexes involving intrinsically disordered proteins. *Int.J.Mol.Sci.* 2011, 12:1410-1430.
3. Tsvetkov P.; Reuven N.; Prives C.; Shaul Y.; Susceptibility of p53 Unstructured N Terminus to 20 S Proteasomal Degradation Programs the Stress Response. *Journal of biological chemistry*, 2009., 284:26234-26242.
4. Ayed A.; Mulder A.A.F.; Yi G.; Lu Y.; Kay E.L.; Arrowsmith C.H.; Latent and active p53 are identical in conformation. *Nature structural biology*, 2001, 8:756-760.
5. Okorokov L.A.; Sherman M.B.; Plisson C.; Grinkevich V.; Selivanova G.; Milner J.; Orlova E.; The structure of p53 tumor suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity.
6. Bell S.; Klein C.; Muller L.; Hansen S.; Buchner J.; p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State. *J. Mol. Biol.*, 2002., 917-927.
7. Okorokov L. A.; Orlova E.; Structural biology of the p53 tumor suppressor. *Current Opinion in Structural Biology*, 2009., 19:197-202.
8. Joerger A.C.; Fersht A.R.; Structural Biology of the Tumor Suppressor p53, *Annu. Rev. Biochem.* 2008., 77:557-582.
9. Wells M.; Tidow H.; Rutheford T.J.; Markwick P.; Jensen M.; Mylonas E.; Svergun D.I.; Blackledge M.; Fersht A. R.; Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *PNAS*, 2008., 105:5762-5767.
10. Dyson H.J.; Wright P.E.; Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2005., 6:197-208.
11. Wright P.E.; Dyson H.J.; Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.*, 1999, 293:321-331.
12. Iakoucheva M.L.; Brown C. J.; Lawson J.D.; Obradović Z.; Dunker A. K.; Intrinsic Disorder in Cell-signaling and Cancer-associated Proteins, *J. Mol. Biol.*, 2002., 323:573-584.

13. Uversky V. N.; Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science*, 2002., 11:739-756.
14. Tompa P.; Intrinsically disorderd proteins: a 10-year recap. *Trends in Biochemical Sciences*, 2012., 37:509-516.
15. Dawson R.; Muller L.; Dehner A.; Klein C.; Kessler H.; Buchner J.; The N-terminal Domain of p53 is Natively Unfolded, *J. Mol. Biol.*, 2003., 332:1131-1141.
16. Stavridi E.S.; Huyen Y.; Sheston E.A.; Halazonetis T.D.; The Three-Dimensional Structure of p53, *The p53 Tumor Suppresor Pathway and Cancer*, 2005.
17. Prives C.; Hall A. P.; The p53 pathway, *J. Pathol.*, 1999., 187:112-126.
18. Tompa P.; Unstructural biology coming of age, *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 21:419-425.

5. SAŽETAK

Intrinzično neuređeni proteini čine veliki dio proteoma stanice. Ovdje je opisan samo mali dio strukture, funkcije i interakcija jednog od mnoštva proteina s intrinzično neuređenim dijelovima koji imaju ključne uloge u životu stanice. Suvremena istraživanja daju nam realniji uvid u stanične procese na molekularnoj razini, te mijenjaju sliku proteinskih interakcija. Tek smo na početku i još mnogo posla čeka buduće strukturne biologe u karakterizaciji intrinzične neuređenosti. Naš koncept funkcionalnog proteina kao statičnog entiteta se mijenja u jedan vrlo dinamični i kompleksni. Također fleksibilnost neuređenih struktura zahtijeva razvoj novih eksperimentalnih pristupa za karakterizaciji ponašanja takvih konformacijskih sklopovina. Kao primjer u radu je poslužio protein p53, ali on ne predstavlja nikakvu iznimku. Isti koncepti se mogu primijeniti i na sve ostale intrinzično neuređene proteine s vrlo važnim ulogama u stanici i u patogenezi. Definitivno se polje strukturne biologije usmjerava na proučavanje intrinzične neuređenosti proteina, i gotovo je sigurno da će u bliskoj budućnosti nestrukturna biologija zauzeti većinski dio tematike u udžbenicima molekularne biologije i biokemije.

6. SUMMARY

Intrinsically unstructured proteins make up a large part of cell's proteome. Here is described only small part of structure, function and interactions of only one of many proteins with intrinsically unstructured segments that have crucial roles in the cells life. Modern discoveries give us insight into a more realistic picture of cell processes on molecular level and change the concept of protein-protein interactions. We are still at the beginning of the new era of structural biology and lot of work is ahead to fully characterize intrinsic disorder in proteins. Our concept of functional protein changes from a static entity to a very complex and dynamic ensemble. Also, flexibility of disordered structures demands development of new experimental approaches for further characterization of those ensembles. Here, p53 was an example, but it is not an exception. The same concepts are applicable on all the others proteins with unconstructed parts of structure that can be important participants in cell life and pathogenesis. Today, field of structural biology is directed to studying protein disorder, and it is almost certain that in the near future, nonstructural biology will occupy most of the subjects in molecular biology and biochemistry textbooks.